



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Máster

Desarrollo de materiales biocompatibles, biodegradables y bioactivos para su aplicación en impresión FDM (modelado por deposición fundida) de implantes para cirugía maxilofacial.

Development of biocompatible, biodegradable and bioactive materials for application in FDM 3D printing (Fused Deposition Modeling) of implants for maxillofacial surgery.

Autor

Daniel Jesús Soto Delgado

Director/es

**Manuel Arruebo Gordo
Martín Prieto Fraga**

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
2018



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

TRABAJOS DE FIN DE GRADO / FIN DE MÁSTER

D./D^a. _____,

con nº de DNI _____ en aplicación de lo dispuesto en el art.

14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster)
_____, (Título del Trabajo)

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, _____

Fdo: _____

Agradecimientos

Este Trabajo Fin de Máster no hubiera sido posible sin la ayuda recibida por parte de mis directores y mis compañeros de laboratorio, a quienes se lo agradezco enormemente. Todos ellos me han enseñado valores dentro de este mundo tan apasionante como es la investigación.

Quería además agradecer a mis compañeros de Máster por todo este gran año, que tanto a nivel profesional, como personal, han hecho posible que cumpliera las metas del curso.

A mi familia, por estar siempre en aquellos momentos necesarios, aportándome la motivación y el cariño que me ha permitido realizar este trabajo.

A todas aquellas personas que hacen de tu día, un día mejor.

Resumen

Desarrollo de materiales biocompatibles, biodegradables y bioactivos para su aplicación en impresión FDM (modelado por deposición fundida) de implantes para cirugía maxilofacial.

En el presente Trabajo de Fin de Master se ha pretendido desarrollar materiales biocompatibles, biodegradables y bioactivos compatibles con la tecnología de impresión 3D FDM, para la posterior fabricación de andamios de regeneración ósea.

Hoy en día las soluciones actuales de medicina regenerativa, en especial para regeneración de tejido óseo, no han conseguido este cometido sin las desventajas existentes cuando se implanta un sustituto óseo. La poca disponibilidad y necesidad de mayores tiempos y costes de operación que presentan los injertos autólogos, o la baja capacidad mecánica o reabsorbilidad en el caso de los materiales sintéticos actuales son, junto con la tendencia que presentan a ser rechazados por el organismo, motivos para continuar los estudios de materiales y formas de fabricación de andamios para regeneración ósea.

Los requisitos que debe cumplir un andamio para regeneración ósea ideal se pueden simplificar en dos grupos. Por un lado los requisitos referentes al material, es decir, a aspectos biológicos y químicos o de composición del material, que son principalmente: una biocompatibilidad que permita no ser rechazado por el cuerpo; una bioreabsorbilidad que favorezca la degradación del material en el organismo una vez cumpla su función; bioactividad para promover la creación de tejido nuevo. Por otro lado, están aquellos requisitos relativos a la estructura de este material, es decir, aspectos físicos, de geometría y de fabricación. Estos últimos son principalmente: una resistencia mecánica suficiente para soportar los esfuerzos en la zona donde se realice la implantación; una porosidad controlada e interconectada capaz de favorecer el crecimiento del tejido; y todo ello se ha conseguir mediante una tecnología de fabricación que permita cumplir estos requisitos con un coste y tiempo adecuados.

Así, visto el importante crecimiento de la tecnología de fabricación la impresión 3D FDM (*Fused Deposition Modelling*) en la actualidad, gracias la gran capacidad que presenta a bajo coste, y a los materiales para aplicaciones médicas compatibles con esta tecnología, como son la policaprolactona (PCL), el ácido poliláctico (PLA) y la hidroxipatita (HA), el objetivo de este trabajo es acercarse lo máximo posible a la consecución de estos requisitos necesarios para la realización de andamios para regeneración ósea.

Abstract

Development of biocompatible, biodegradable and bioactive materials for application in FDM 3d printing (fused deposition modeling) of implants for maxillofacial surgery.

The aim of this Master's Thesis is to develop biocompatible, biodegradable and bioactive materials compatible with 3D FDM printing technology for the subsequent manufacture of bone regeneration scaffolds.

Today, the current solutions of regenerative medicine, especially for bone tissue regeneration, have not achieved this task without the disadvantages that exist when a bone substitute is implanted. The low availability and need for longer operating times and costs of autologous grafts, or the low mechanical capacity or resorbability in the case of current synthetic materials are, along with the tendency to be rejected by the body, reasons for continuing studies of materials and forms of scaffolding manufacture for bone regeneration.

The requirements for an ideal bone regeneration scaffold can be simplified in two groups. On the one hand, the requirements concerning material, i. e. biological and chemical aspects or composition of the material, which are mainly: a biocompatibility that allows it not to be rejected by the body; a bioreabsorbability that favours the degradation of the material in the organism once it fulfills its function; bioactivity to promote the creation of new tissue. On the other hand, there are those requirements relating to the structure of this material, i. e. physical, geometric and manufacturing aspects. The latter are mainly: a sufficient mechanical resistance to withstand the stresses in the area where the implantation is carried out; a controlled and interconnected porosity capable of favouring tissue growth; and all this has been achieved through a manufacturing technology that allows these requirements to be met at an appropriate cost and time.

Thus, given the important growth of 3D FDM (Fused Deposition Modelling) printing technology today, thanks to the large capacity it presents at low cost, and to materials for medical applications compatible with this technology, such as polycaprolactone (PCL), polylacticoglycolic acid (PLGA) and hydroxyapatite (HA), the aim of this work is to get as close as possible to the achievement of these.

Contenido

1	Introducción.....	1
1.1	Ingeniería de tejidos: Introducción general. Regeneración ósea.	1
1.2	Requisitos de andamios para regeneración ósea: estructura, materiales y estado del arte.....	4
1.3	Tecnología de fabricación: Introducción general. Impresión 3D en medicina: tecnologías materiales y estado del arte.....	9
1.4	Objetivos y justificación del trabajo.	14
2	Validación de la idoneidad de la tecnología de impresión mediante deposición de material fundido en la fabricación de andamios porosos poliméricos.	15
2.1	Objetivos.....	15
2.2	Métodos y materiales.....	15
2.3	Resultados y discusión.....	17
3	Extrusión de filamentos de PCL, PCL-PLGA, PCL-HA y PCL-PLGA-HA	20
3.1	Objetivos.....	20
3.2	Métodos y materiales.....	20
3.3	Resultados y discusión.....	23
4	Impresión de andamios porosos de PCL, PCL+PLGA, PCL+HA y PCL+PLGA+HA	26
4.1	Objetivos.....	26
4.2	Métodos y materiales.....	26
4.3	Resultados y discusión.....	31
5	Conclusiones y trabajo futuro	47
5.1	Conclusiones:	47
5.2	Trabajo Futuro:	47
6	Bibliografía	48
A.	ANEXOS.....	50
	Funcionamiento, componentes y conexión de la extrusora.....	50

1 Introducción

1.1 Ingeniería de tejidos: Introducción general. Regeneración ósea.

La ingeniería de tejidos se puede definir como la rama científica multidisciplinar que combina la biología celular, la ciencia de los materiales, la ingeniería, y la medicina regenerativa. Este campo ha supuesto gran interés en los últimos años como estrategia para tratar órganos y tejidos dañados que no pueden auto-regenerarse, como quemaduras completas de la piel, defectos óseos de tamaño crítico y enfermedades crónicas del cartílago.

Como dato relevante, cabe mencionar que las enfermedades degenerativas y fracturas óseas afectan a millones de personas en todo el mundo. Precisamente, se espera que el porcentaje de personas afectadas mayores de 50 años aumente el doble para el año 2020, provocando un empeoramiento de la calidad de vida de estas personas. Además, el injerto óseo es el segundo trasplante tisular más común detrás de la sangre, estimándose en Estados Unidos, sobre 2.2 millones de intervenciones anuales con un coste de 2.5 billones de dólares [1].

La influencia y dimensión de este tipo de patologías conllevan a la búsqueda y continuación de la investigación y desarrollo en este ámbito, en el cual se está trabajando desde hace unos años. Aun así, a pesar de todas las innovaciones recientes en técnicas de reparación ósea, el injerto óseo autólogo sigue siendo considerado el tratamiento “ideal” o “patrón oro” (*gold standard*) para defectos como los de hueso largo o regiones cráneo-maxilofaciales (por ej. injerto procedente de la cresta ilíaca, Ilustración 1). Sin embargo, presentan importantes limitaciones como la posibilidad de desprendimiento e inflamación o infección, osteólisis y muerte del tejido óseo con la consecuente agravación de la zona, mayor tiempo de operación, poca disponibilidad de material, una morbilidad y carga socioeconómica significativas. Otras alternativas son aquellas relacionadas con aloinjertos (injerto de otra persona) o xenoinjertos (injerto de otra especie) con sus respectivas desventajas como puede ser el rechazo inmune, una integración lenta y parcial y una mala absorción y sustitución con el hueso nuevo [2]. Además, los materiales sintéticos empleados aún no tienen una interacción adecuada con el organismo, fallando con el tiempo debido a la fatiga o a una reacción adversa de este.



Ilustración 1. Extracción de injerto de la cresta ilíaca [3].

Del mismo modo, los defectos óseos representan hoy en día un desafío para los cirujanos ortopédicos, siendo necesario emplear procedimientos quirúrgicos invasivos para reconstruir la estructura del hueso dañado. Esto supone un mayor número de operaciones y post-operaciones,

mayores tiempos y costes de quirófano y, por supuesto, un empeoramiento del bienestar del paciente.

Estos motivos crean así la necesidad de estudio de una nueva generación de implantes biodegradables y biocompatibles para sustituir a los tradicionales, corrigiendo las desventajas de los actuales. Este tipo de implantes o andamios (*scaffolds*, Ilustración 2), gracias a características como su biodegradabilidad, presenta ventajas frente a un implante metálico permanente.

La ingeniería de tejidos por tanto, tiene como objeto mejorar los tratamientos clínicos convencionales y subsanar los inconvenientes asociados a estos. Su idea principal se basa en la fabricación de un andamio biológicamente compatible que permita albergar células vivas junto con su proliferación y diferenciación, favoreciendo así la regeneración de tejido tanto in vitro como in vivo. Es por ello que debe cumplir con unas características principales como son la biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad, porosidad alta e interconectada y, mecánicamente similar al tejido original, entre otras.

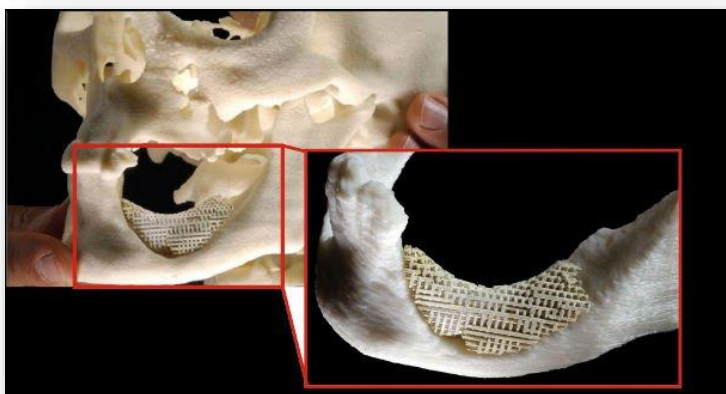


Ilustración 2. Andamio de recuperación de defecto óseo en maxilar inferior.

Tomando como referencia el tejido óseo, en el cual se centra este trabajo, las características esenciales que debe presentar un andamio para su regeneración se pueden dividir en dos grupos, las intrínsecas al material, y las referentes a la morfología y estructura del andamio.

Los requisitos intrínsecos al material cubren aspectos biológicos y químicos o de composición y destacan una buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad. Por otro lado, los requisitos estructurales están relacionados con aspectos físicos y geométricos, como por ejemplo, un tamaño determinado y una porosidad bien interconectada, junto con una resistencia mecánica apropiada para resistir los esfuerzos a los que estará sometido. Más adelante, se detallarán con más profundidad estos requisitos. De esta forma, se hace necesario conocer la anatomía y fisiología ósea para llegar a conseguir la máxima mimetización del andamio con el tejido.

El tejido óseo presenta un papel importante en el organismo pues es el encargado otorgar el soporte estructural del cuerpo, proteger a los órganos vitales y además, sirve de suministro para la producción de células sanguíneas, almacenamiento de minerales, homeostasis y regular el pH de la sangre. A escala macroscópica puede dividirse en dos zonas principales, una capa externa y compacta (hueso cortical; $\approx 10\%$ porosidad) y otra de menor densidad (hueso trabecular o esponjoso; $\approx 50\text{-}90\%$ porosidad). A menor escala, se encuentra la matriz extracelular ósea (MEC)

formada por un componente orgánico no mineralizado (principalmente colágeno tipo I) y un componente inorgánico mineralizado (compuesto por minerales de apatita carbonatada del orden de 4 nm de espesor [4]). A su vez, están presentes diferentes tipos de proteínas como glicoproteínas, proteoglicanos y sialoproteínas, que contribuyen a la existencia de las distintas señales del entorno extracelular (Ilustración 3). Así, gracias a la estructura nanocompuesta formada principalmente por fibras de colágeno (resistentes y flexibles) reforzadas con cristales de hidroxiapatita (HA), el hueso presenta una gran resistencia a la compresión.

En las cavidades de esta matriz extracelular, se encuentran las células óseas como los osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células osteogénicas.

Las células osteogénicas (u osteoprogenitoras) están muy activas durante la fase de crecimiento y reparación ósea, teniendo capacidad para proliferar y diferenciarse en osteoblastos, los cuales se encargan de sintetizar y mineralizar las proteínas de la matriz ósea. Cuando éstos han perdido la capacidad de síntesis y quedan atrapados en la matriz, se denominan osteocitos, y su función principal es mantener el buen estado de la misma, con capacidad de reabsorberla y producirla. Por otro lado, los osteoclastos son células multinucleadas cuya función principal es la degradación y reabsorción del tejido. Estas junto con los osteoblastos están implicadas en la remodelación del hueso [4].

Todas ellas constituyen una red de conexión, encargadas de responder de forma óptima ante la influencia, entre otros factores, de fuerzas mecánicas que recibe el tejido, transduciendo mensajes que inician respuestas de remodelación.

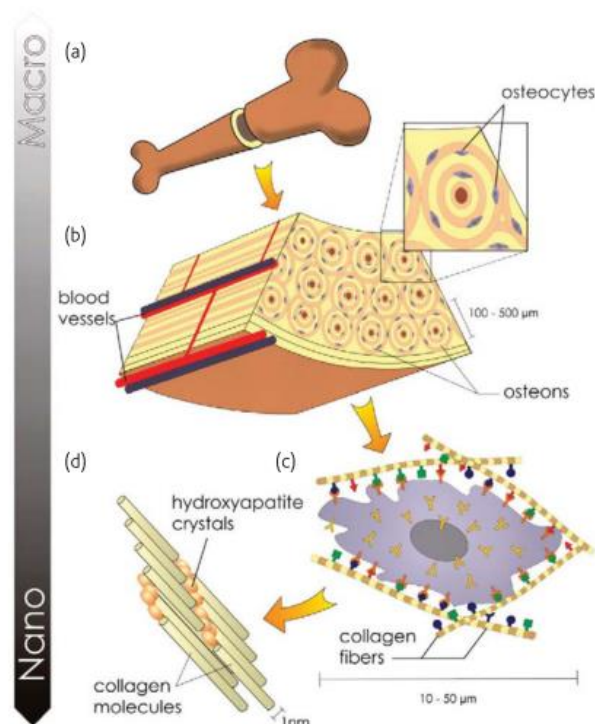


Ilustración 3. Estructura tejido óseo (M.M. Stevens et al., 2008).

La remodelación (proceso encargado de la eliminación y formación de hueso), se puede dividir básicamente en los siguientes pasos: (1) activación, donde osteoclastos inmaduros se diferencian a osteoclastos multinucleados; (2) reabsorción o eliminación por parte de los

osteoclastos del hueso viejo o dañado; (3) reabsorción completa de la matriz ósea; (4) formación de hueso, osteoblastos producen nueva matriz ósea; y (5) osteoblastos son transformados en células inactivas, revestimiento óseo (Ilustración 4).

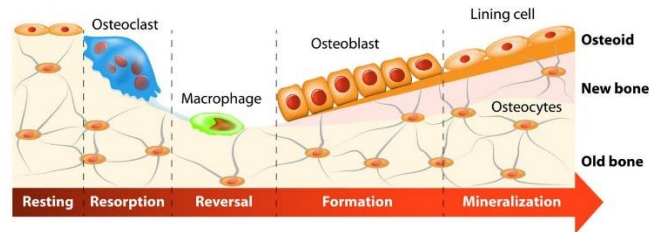


Ilustración 4. Proceso de remodelación ósea [5].

Esta serie de procesos no se llevan a cabo siempre de forma eficaz, siendo un factor crítico el tamaño del defecto óseo, provocando el fallo de la regeneración espontánea del hueso y siendo requerida la intervención quirúrgica. Así, esta necesidad de reconstruir con éxito este tipo de defectos óseos, ha llevado a la búsqueda de una eficiente ingeniería de tejidos (medicina regenerativa) durante los últimos 20 años [6].

1.2 Requisitos de andamios para regeneración ósea: estructura, materiales y estado del arte.

Un buen **scaffold** debe presentar una serie de requisitos, como pueden ser [7]:

- **Biofuncionalidad:** habilidad del *scaffold* para realizar las funciones para las que fue diseñado, restaurando las funciones de tejido reemplazado.
- **Biocompatibilidad:** capacidad de soportar una correcta actividad celular junto con sistemas de señalización molecular. Permite evitar efectos indeseables como la citotoxicidad, la genotoxicidad, la inmunogenicidad, la mutagenicidad, la trombogenicidad y la inflamación.
- **Bioreabsorbilidad y biodegradabilidad:** esta cualidad permite al *scaffold* degradarse con tiempo en condiciones *in vitro* o *in vivo*. Lo ideal es un grado de reabsorción controlado que permita crear nuevos espacios para la continua proliferación y crecimiento celular, de forma que exista una coordinación entre el crecimiento del tejido y la degradación del material. Está relacionado con la biocompatibilidad ya que los productos degradados han de ser no tóxicos y capaces de ser metabolizados y eliminados por el cuerpo.
- **Radiolucidez:** diferenciarse radiográficamente con respecto al tejido donde se implanta.
- **Propiedades mecánicas:** módulo elástico, límite elástico, tenacidad a la fractura, fatiga y porcentaje de elongación son propiedades que deben ser lo más parecidas posibles al tejido reemplazado. Están relacionadas con la bioreabsorbilidad ya que la variación de estas debido al proceso de degradación ha de ser compatible con el proceso de regeneración ósea.
- **Tamaño de poro y porosidad:** esta estructura determina la distribución y localización espacial de las células, nutrientes, oxígeno y la extracción de los productos de desecho, por lo que afecta a la viabilidad de la formación del nuevo tejido. Los andamios deben tener una gran superficie interna debido a la porosidad total y el tamaño de los poros. Una superficie grande permite la adhesión celular y la proliferación y por otro lado un gran volumen de poro es requerido para contener y después suministrar una población

celular suficiente para el proceso de cicatrización o regeneración. También resulta necesaria la interconexión de los poros y evitar una alta porosidad para favorecer la transferencia de masa y la migración celular, junto con una buena vascularización del tejido. Conjuntamente, un aumento en la porosidad implica una disminución de las propiedades mecánicas tales como la resistencia a la compresión y aumenta la complejidad para la fabricación del andamio. Cabe destacar que el tejido óseo suele estar alineado en superficies curvas, por lo que, siguiendo ese patrón biomórfico, se pretende que los poros tengan secciones transversales curvadas.

- **Fabricación:** es necesario que tengan unas cualidades de fabricación deseadas para su correcta producción (por ejemplo, que se produzcan fácilmente formas irregulares de andamios que coincidan con los defectos en el hueso de pacientes concretos). Así, resulta importante tener un buen diseño en todos los niveles, macro, micro y nano. La parte macro se basa en la forma global del material, su tamaño y su masa, pudiendo ser bastante compleja en función del paciente. La microarquitectura refleja la arquitectura tisular como puede ser el tamaño de poro, forma, porosidad, distribución espacial, ratio superficie/volumen e interconexión de poros. Y por último, la nanoarquitectura engloba las modificaciones superficiales, por ejemplo, fijación de biomoléculas para la adhesión celular, proliferación y diferenciación. Además, la química del elemento a fabricar, la composición, estructura y peso molecular del biomaterial deben ser considerados.
- **Comercialización:** el factor principal en este caso es una fabricación de bajo coste que permita su comercialización.

Además de estas características citadas, un material sustitutivo óseo ideal debe ofrecer una estructura tridimensional osteoinductiva (presentar la facultad de formar tejido óseo ectópicamente), para que las células osteogénicas del paciente lo colonicen y generen tejido, promover la vascularización, como también presentar propiedades mecánicas adecuadas.

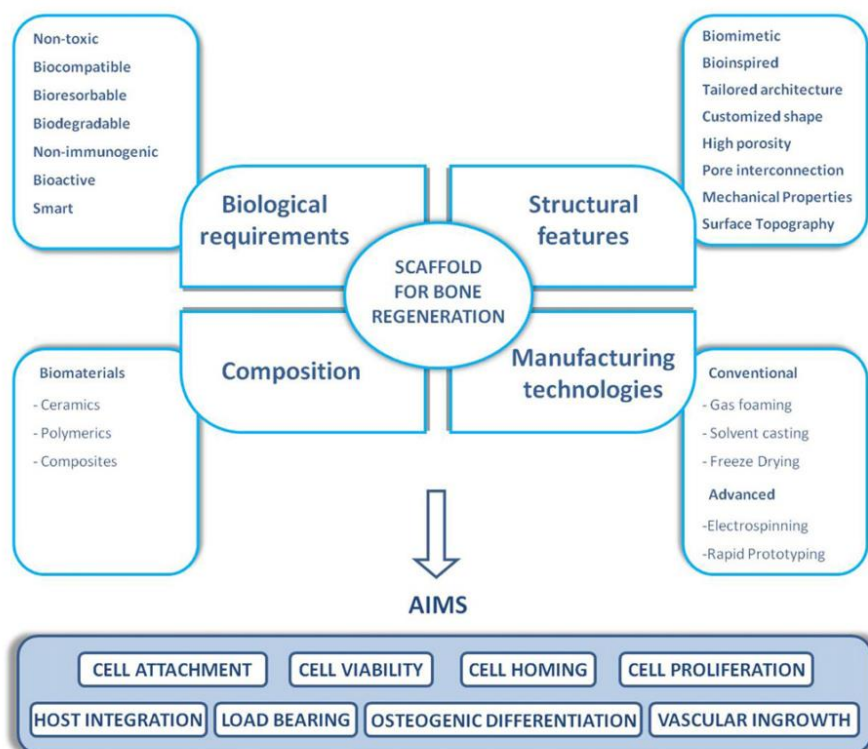


Ilustración 5. Requisitos de un andamio en su desarrollo para regeneración ósea (L. Roseti et al. 2017).

A pesar de la extensa investigación en este campo de la ingeniería de tejidos, incluyendo el autoinjerto "*gold standard*", hoy en día ningún sustitutivo óseo ofrece todas estas propiedades en un solo material. Es el motivo por el cual existe un continuo estudio de la viabilidad de los distintos materiales o combinaciones de ellos, junto con una tecnología de fabricación compatible, adecuada para regeneración ósea.

A lo largo del tiempo algunos materiales para este propósito han sido empleados y evaluados. La selección de éstos viene determinada principalmente por la composición del tejido óseo, el cual está compuesto en su matriz extracelular (ECM) principalmente de hidroxiapatita (HA) embebida dentro de una matriz de colágeno (polímero biológico) y agua. A continuación, se mencionan algunos de estos materiales empleados [7,8].

Injertos

Como se ha comentado, una de las soluciones que se aplican hoy en día en este ámbito son los injertos. La regeneración ósea a partir de la extracción de tejido del propio paciente (autoinjerto) es considerado actualmente como la solución ideal por su osteoinductividad, osteoconductividad y osteogénesis. Se extraen de zonas de hueso que no están bajo carga mecánica (por ej. la cresta ilíaca). Este tipo de injertos presentan células y factores de crecimiento que favorecen la regeneración ósea con un bajo riesgo de rechazo y transmisión de enfermedades. Las desventajas giran en torno a las posibles cirugías adicionales e infecciones, como también el dolor y una disponibilidad limitada.

Aparecen también los injertos procedentes de la misma especie (aloinjertos) o de distinta especie (xenoinjerto). Los primeros tienen ventajas como disponibilidad inmediata y fácil manejo, pero requieren tratamientos para prevenir el rechazo y las posibles infecciones, además de poseer una baja osteoconductividad y osteoinductividad. Los xenoinjertos provienen principalmente de vacas y corales presentando características osteoinductivas y osteoconductivas a un bajo coste y alta disponibilidad pero presenta riesgo de transmisión de enfermedades de animales o respuesta inmune.

Andamios cerámicos

Se pueden destacar también los materiales inorgánicos, tanto óxidos como sales, los cuales son empleados para regeneración ósea debido a la alta similitud de estos con la composición natural del hueso (fosfatos de calcio) o por su capacidad de crear uniones fuertes al tejido óseo (biovidrios).

Las formas actuales en el uso clínico incluyen piezas sólidas (por ej. como componentes portadores de prótesis de articulación). En función de su respuesta tisular, las biocerámicas pueden clasificarse en tres familias principales: casi inertes (por ej., alúmina y zirconia), bioactivas (por ej., vidrios bioactivos) y reabsorbibles (por ej., β - y α -fosfato tricálcico).

Los **fosfatos de calcio** son materiales bioactivos gracias a la habilidad que tienen para formar material de apatita ósea o hidroxiapatita (HA) de carbonato en sus superficies, lo cual promueve la función celular y su expresión. Entre ellos destaca la HA, un fosfato de calcio cristalino presente en los huesos.

Por otro lado, los **biovidrios**, presentan una ventaja principal sobre fosfatos de calcio como la HA, y es un mayor ratio de degradación. Una capa de hidroxycarbonato apatita (HCA) se forma sobre la superficie del vidrio seguido de una disolución del mismo. El HCA es similar al mineral del hueso e interactúa con el colágeno para unir el biovidrio con el tejido huésped mejorando la estimulación del crecimiento de tejido nuevo.

Respecto a las desventajas que puede presentar este tipo de materiales, cabe mencionar la fragilidad y baja resistencia a fatiga que presentan, muy influyente sobre todo a altos esfuerzos.

Andamios poliméricos

Los biopolímeros son materiales orgánicos sintéticos biocompatibles que pueden tener origen natural o sintético.

Los polímeros de origen **natural** son aquellos inspirados en la matriz extracelular como por ej. el colágeno, los cuales presentan características de tejido óseo favoreciendo la adhesión y migración celular a través de sus poros. El colágeno es el principal componente del tejido conectivo en mamíferos, (en especial, el colágeno de tipo I).

En cuanto a las desventajas que pueden presentar destaca la poca versatilidad para ser modificados, lo que no ocurre con los polímeros del segundo grupo (sintéticos), los cuales aportan la capacidad de modificación en su síntesis pudiéndolo adaptar al objetivo a perseguir.

Los polímeros **sintéticos** (empleados en este trabajo) están en continuo desarrollo. Son biodegradables, no tóxicos, biocompatibles y se degradan principalmente por hidrólisis. Entre ellos destacan:

- Ácido poliglicólico (**PGA**): es un polímero altamente cristalino (45 - 55% de cristalinidad) lo que le aporta altas propiedades mecánicas. Presenta una excelente degradabilidad (se hidroliza en 1-2 meses), siendo necesario en ocasiones reducirla, junto con la reducción de sus productos de degradación, a partir de su copolimerización. En el cuerpo, el producto de degradación de la PGA es la glicina que puede ser excretada en la orina o convertida en dióxido de carbono y agua a través del ciclo del ácido cítrico.
- Ácido poliláctico (**PLA**): es un biopolímero termoplástico que presenta una buena biodegradabilidad y biocompatibilidad. Su molécula quiral existe en dos formas ópticamente activas: L-lactida y D-lactida. Forma parte de numerosas aplicaciones pues presenta un rango de propiedades, desde el estado amorfo al cristalino, las cuales se pueden conseguir modificando las cantidades de los isómeros (L-lactida y D-lactida), los pesos moleculares, o a partir de la copolimerización.
- Ácido poli-L-láctico (**PLLA**): baja velocidad de degradación comparado con el PGA, teniendo una resorción total *in vivo* de entre 2 y 5-6 años para altos pesos moleculares. Presenta buenas propiedades mecánicas habiéndose empleado para aplicaciones de carga, como dispositivos de fijación ortopédicos.
- Ácido poliláctico-co-glicólico (**PLGA**): tanto los L- como los DL-lácticos se han utilizado para la copolimerización con monómeros de glicólicos con el fin de obtener diferentes velocidades de degradación. Las velocidades de degradación de PLGA dependen de una variedad de parámetros incluyendo la relación PLA / PGA, el peso molecular y la forma y estructura de la matriz. Por ejemplo, una concentración al 50/50 (%) de ácido poli (DL-láctico-co-glicólico) se degrada en aproximadamente 1-2 meses, una al 75/25 (%) de

PLGA en 4-5 meses y al 85/15 (%) en 5-6 meses. La popularidad de estos copolímeros se puede atribuir a la aprobación de la FDA para su uso en los seres humanos y su buena procesabilidad.

- Policaprolactona (**PCL**): es un poliéster semicristalino obtenido por la polimerización de apertura de anillo de unidades monómeras de " ϵ -caprolactona". El PCL presenta degradación hidrolítica con una velocidad de degradación lenta (2-3 años) con respecto a polímeros como PLA. Tiene una resistencia a la tracción alrededor de 23 MPa y alto alargamiento en la rotura (>700%), pudiendo utilizarse conjuntamente con otros materiales para aplicaciones de carga.

Como parte negativa, los polímeros carecen de bioactividad y dificultan las interacciones biomaterial-huésped requeridas. Además, en ciertas ocasiones sus productos de degradación incluyen productos ácidos perjudiciales, obstaculizando la regeneración del tejido. Una solución a esta carencia de bioactividad es la realización de compuestos poliméricos y cerámicas bioactivas como la hidroxiapatita (HA), tratados en este trabajo.

Metales

Dada las pobres propiedades mecánicas que pueden presentar materiales como los polímeros, surgen estudios de investigación de metales biodegradables. Estos ofrecen unas propiedades mecánicas cercanas al hueso y con un comportamiento de degradación aceptable.

Los metales más usados tradicionalmente, como son el acero inoxidable y las aleaciones de titanio, presentan grandes ventajas como la resistencia a corrosión en el medio fisiológico, pero también inconvenientes como una pérdida de densidad ósea en las zonas cercanas al material (apantallamiento mecánico: distinta deformación entre hueso e implante bajo la misma carga, conlleva a su rozamiento y desgaste). Además, para este tipo de materiales se hace necesaria una segunda intervención para retirarlos una vez se cumple su función.

Esto ha provocado el estudio de materiales como el magnesio (Mg) y sus aleaciones, el cual presenta gran capacidad de disolución en el medio fisiológico, siendo expulsado del cuerpo de forma natural (orina) una vez queda completada su función. Además, presenta propiedades bastante cercanas al hueso humano, mostrando resultados alentadores para regeneración ósea. Como desventaja cabe mencionar que la velocidad de degradación es mayor a la deseada, y es por esto que se está investigando reducir este fenómeno a partir de recubrimientos de fosfatos de calcio, el cual no solo permitiría alargar la vida del magnesio, sino además, favorecer la generación del tejido alrededor del material [9].

Como se puede comprobar, cada biomaterial tiene propiedades materiales y mecánicas específicas, métodos de procesamiento, propiedades químicas, interacciones célula-material y su correspondiente aprobación de la FDA, como también, un proceso de fabricación más adecuado.

La justificación del material empleado en este trabajo se comentará en el apartado siguiente, ya que la elección de éste viene en gran medida determinada por el tipo de tecnología de fabricación a emplear, la cual ayudará a conseguir los requisitos de andamios para regeneración ósea.

Materiales compuestos

La dificultad de un biomaterial para satisfacer todos los requisitos necesarios en el ámbito de la medicina regenerativa ha llevado al desarrollo de materiales híbridos o compuestos. Esto consiste en la combinación de dos o más biomateriales para conseguir una función más óptima. Destacan los copolímeros, mezclas polímero-polímero-polímeros o compuestos polímero-cerámicos:

- **Copolímeros:** son derivados de dos o más especies monoméricas. Destaca, como se ha comentado anteriormente, el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). Por un lado el ácido poliláctico (PLA), muestra una temperatura de transición vítrea (T_g , por encima de la cual el material es blando y flexible) por encima de la temperatura ambiente y un tiempo de degradación largo, mientras que el ácido poliglicólico (PGA) muestra una T_g por debajo de la temperatura ambiente y un tiempo de degradación más corto. El copolímero desarrollado a partir de estos dos (PLGA) permite un ajuste de T_g y la degradación en función de las necesidades.
- **Mezclas de polímero-polímero (bending):** Requiere de polímeros que presenten interacciones intermoleculares o de Van der Waals, que permita crear una mezcla miscible con unas propiedades mejoradas. Un ejemplo puede ser la mezcla de PLGA con polifosfatenos. Es sabido que el PLGA produce subproductos ácidos al degradarse, que puede llevar a necrosis tisular y fracaso del implante durante largas exposiciones en el tejido. Por otro lado, los polifosfatenos liberan productos neutros o básicos en su degradación, permitiendo obtener biomateriales novedosos con productos de degradación casi neutros.
- **Composites polímero-cerámicos:** El empleo de materiales compuestos ha resultado de gran atracción para aplicaciones de ingeniería tisular en hueso. Esto es, porque el hueso es un material compuesto, formado por una mezcla de cristales inorgánicos de hidroxiapatita (HA) y fibras orgánicas de colágeno. Así, los compuestos polímero-cerámicos aportan las ventajas de cada uno de sus componentes, demostrando su éxito en la regeneración ósea en comparación a cuando se emplean por separado. Por ejemplo, S. A. Park et al. (2011) demostraron que los andamios de PCL mejoraban la fijación, proliferación y diferenciación celular con la presencia de HA en el polímero [10]. A su vez, al implantarse, estos materiales han demostrado una mejora de la bioactividad y propiedades mecánicas con la adición de HA, mejorando también los efectos adversos asociados a la degradación [11].

1.3 Tecnología de fabricación: Introducción general. Impresión 3D en medicina: tecnologías materiales y estado del arte.

Sobre la década siguiente al año 1993 creció el interés de fabricación de andamios 3D porosos a partir de técnicas convencionales como separación de fases, colada de disolventes, lixiviación en partículas y laminación de membranas. Sin embargo, la principal desventaja que acarreaban estos métodos era el insuficiente control sobre la arquitectura del andamio, como la red de poros y tamaño de los mismos. Además, los procesos de fabricación en serie carecen de personalización, con unos costes más elevados [12].

La búsqueda de fabricar andamios ideales incentivó el uso de métodos de impresión 3D (también conocidos como prototipado rápido o fabricación aditiva). Esto permitía fabricar

andamios personalizados con tamaño de poro controlado y estructura de poros. Así, la impresión 3D ha adquirido un papel importante en los últimos años en la fabricación de tejidos, ya sea a través andamios o basados en ellos creando el entorno estructural biomimético adecuado para facilitar la formación de tejido y promover integración del tejido huésped.

Por tanto, esta tecnología ha demostrado un control estructural en la fabricación de escala micro a macro a partir del enfoque capa por capa, existiendo además, distintos métodos de construcciones para ingeniería de tejidos como la estereolitografía (SL), el modelado por deposición fundida (FDM), sinterización selectiva por láser (SLS), impresión 3D “solvent casting”, *inkjet* y *bioprinting* [12,13].

Este tipo de procesos se conocen como **prototipado rápido** y un breve resumen del funcionamiento de cada uno de ellos es el siguiente:

- **Estereolitografía (SL)**: se basa en la fabricación de objetos sólidos capa a capa a partir de un material curable mediante un láser ultravioleta. Un láser incide sobre un baño de resina fotopolimerizándola capa a capa hasta obtener la pieza deseada.

El material empleado en este proceso son resinas fotocurables. Se polietilenglicol dimetacrilato (PEG-DMA) y polietilenglicol diacrilato (PEG-DA) etiquetados con dextrano, PEG bioactivo o PEG bioactivo fluorescentes en diferentes regiones del andamio. Además, recientemente se ha ampliado el número de resinas haciendo síntesis con segmentos de PCL o ácido poliláctico y resinas de ácido poliláctico sin el uso de disolventes reactivos.

- Ventajas: capacidad de crear piezas complejas con arquitectura interna a gran resolución y con buenas propiedades mecánicas.
- Desventajas: las resinas empleadas pueden presentar citotoxicidad, lo que parece ser un problema importante de esta técnica. Los materiales con altas propiedades mecánicas para esta tecnología no presentan biocompatibilidad, mientras que aquellos biocompatibles, como los basados en PEG, presentan bajas propiedades mecánicas [14].

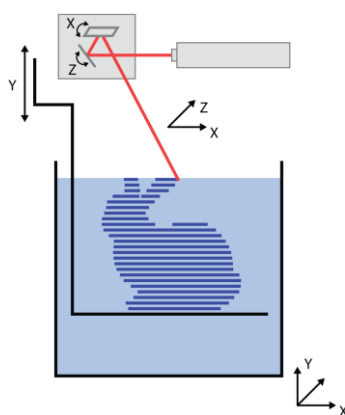


Ilustración 6. Estereolitografía, SL (R. Couto et al., 2016).

- **Modelado por deposición fundida (FDM)**: consiste en la deposición de material termoplástico fundido sobre una base a partir de un extrusor. El material se va depositando sobre la plataforma de trabajo capa a capa, las cuales se funden entre ellas para formar el objeto. El material compatible con esta tecnología es un

filamento que se hace pasar previo calentamiento por una boquilla encargada de depositar el material. Tecnología empleada en este trabajo.

Para aplicaciones biológicas, la policaprolactona (PCL) es comúnmente usada debido a su baja temperatura de fusión, apareciendo combinaciones de ésta con vidrios bioactivos, L-láctico/e-caprolactona, PLGA con infiltración de colágeno, PCL-TCP con gentamicina (antibiótico para evitar infecciones), PCL-TCP, PLGA-TCP revestido de HA (filamento realizado en molde), PCL-PLGA-TCP, PLGA-PCL, PCL revestido con gelatina, PCL, PMMA y PLA.

- Ventajas: capacidad de realizar piezas de geometría compleja a bajo coste.
- Desventajas: la elección del material debe presentar las características de transferencia de calor y reológicas adecuadas para un buen comportamiento del fluido y, por supuesto, que sea biocompatible. Por otro lado existe la incapacidad de incorporar células vivas o agentes biológicos sensibles a la temperatura en el proceso de impresión debido a la alta temperatura del proceso.

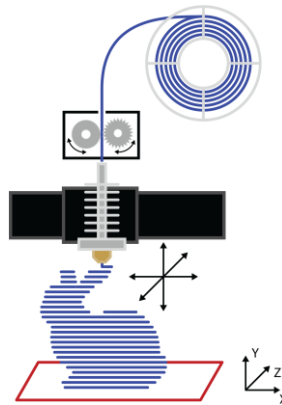


Ilustración 7. Modelado por deposición fundida, FDM (R. Couto et al., 2016).

- **Sinterización selectiva por láser (SLS):** se basa en la unión de partículas del material capa a capa con un láser de alta potencia. El espacio de trabajo es calentado por debajo de la temperatura de fusión del material para favorecer al láser llegar a la temperatura de trabajo. La incidencia del láser sobre las partículas provoca la unión de éstas por calor. Una vez terminada la capa, se vuelven a depositar partículas para realizar la siguiente capa. Como en los anteriores métodos, la geometría del objeto viene definida a partir de un modelo CAD.

Los avances recientes de este método se destaca en la habilidad para producir andamios poco rígidos y de gran resolución. Los materiales más comunes empleados en esta tecnología son PCL con HA, PCL con β -TCP recubierto de colágeno, Ca-P/PHBV (Calcio-Fósforo/Poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)), CHAp/PLLA (hidroxiapatita carbonatada/ácido poliláctico) y PVA.

- Ventajas: procesamiento de materiales sin el uso de disolventes orgánicos o compuestos químicos tóxicos. A su vez, no necesita de estructura soporte ya que el propio polvo del material no procesado realiza esta función.

- Desventajas: eliminación del material residual al final del proceso y las altas temperaturas de trabajo, que limitan el uso de materiales debido a la posible descomposición de los mismos.

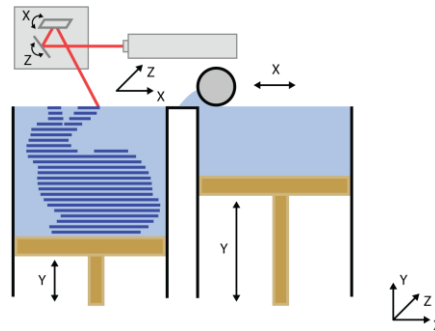


Ilustración 8. Sinterización selectiva por láser, SLS (R. Couto et al., 2016).

- **Impresión 3D “solvent casting”**: consiste en la deposición de capas de material disuelto en un disolvente volátil. Durante la deposición el disolvente se evapora haciendo que el material adquiera una conformación rígida. Se desarrolló para superar las limitaciones de fabricación de filamentos de ciertos materiales.

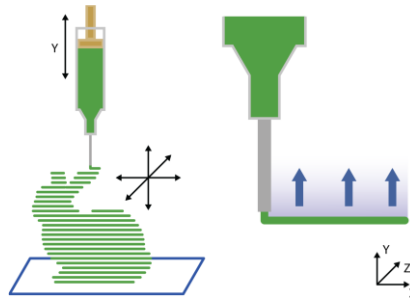


Ilustración 9. Solvent casting (R. Couto et al., 2016).

- **Inkjet**: consiste en la fabricación de piezas tridimensionales a partir de una solución de aglutinante líquido sobre un lecho de polvo. Al igual que en la sinterización por láser, el material se renueva capa a capa y en este caso, las partículas se unen mediante un aglutinante.

Se han utilizado materiales como polifosfato de calcio y acetato de polivinilo (PVA), hidroxiapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP), TCP dopado con óxido de estroncio y magnesio, HA y vidrio de apatita-wollastonita con agua como aglutinante, fosfato de calcio con colágeno, PLGA y polvo de fosfato de magnesio ($Mg_3(PO_4)_2$).

- Ventajas: amplia gama de materiales a usar debido al procesamiento a temperatura ambiente, habilidad de imprimir arquitecturas internas, bajo coste y tiempo, y control a nivel microscópico.
- Desventajas: limitación del uso de disolventes orgánicos como aglutinantes debido a la disolución de las cabezas de impresión comerciales, y la dificultad para eliminar el material sobrante de zonas estrechas.

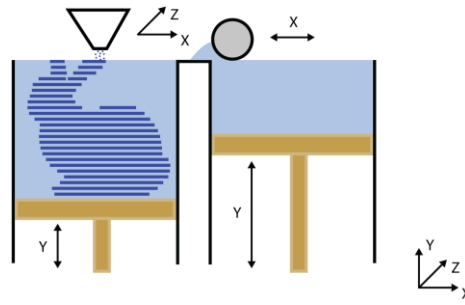


Ilustración 10. Inkjet (R. Couto et al., 2016).

- **Bioprinting:** se basa en la extrusión de un material líquido viscoso y unidades celulares (generalmente una disolución, pasta o dispersión) desde una jeringuilla presurizada a un medio líquido de densidad similar. El objetivo es formar estructuras semejantes a tejidos.

Se incluyen materiales como PLGA, TCP, colágeno con quitosano, quitosano, compuestos de colágeno-alginato-sílica recubiertos de HA, proteína de soya y agarosa con gelatina. También, estudios recientes han observado la capacidad de imprimir unidades de células, como también estas incluidas en andamios formados por hidrogeles y PCL.

- Ventajas: proceso a temperatura ambiente, incorporación directa de células y distribución homogénea de estas con precisión micrométrica.
- Desventajas: rigidez mecánica limitada, la sincronización crítica del tiempo de gelificación, la adaptación específica del material, las densidades del medio líquido para preservar las formas y la baja resolución.

En la fabricación de los andamios, es muy importante tener en cuenta en su diseño una serie de factores, como se ha comentado en apartados anteriores, que puedan llevarse a cabo por la tecnología correspondiente.

La elección de la tecnología de fabricación para este trabajo se ha basado en estudios como se contemplan donde se ha comprobado la capacidad que tiene la fabricación aditiva para crear este tipo de andamios (L. Roseti et al., 2017). Por ejemplo, J. Korpela et al., comprobaron la viabilidad mecánica y biocompatibilidad de ciertos polímeros, entre ellos policaprolactona (PCL), para la fabricación de andamios [15]. Esto ha impulsado este trabajo a reproducir este tipo de andamios con esta tecnología, en especial, la impresión 3D por deposición fundida (*FDM: Fused Modelling Deposition*), la cual destaca de las otras opciones de prototipado rápido por su fabricación con buena resolución, personalizada y a bajo coste.

Teniendo en cuenta los distintos factores que debe presentar un andamio ideal, en el momento de fabricación resulta necesario hacer un análisis del material más adecuado para cada uno de ellos, junto con el proceso de fabricación asociado. Esto supone que existan desafíos con la selección de biomateriales y la especificidad de la forma 3D.

Así, los biomateriales utilizados para esta tecnología, de los cuales se ha hablado en el apartado anterior, deben ser termofusibles para que sean compatibles con la impresión 3D FDM. Por tanto, en este trabajo se han empleado polímeros termoplásticos sintéticos (PCL, PLGA), dopados de material cerámico (HA) en ciertas ocasiones.

1.4 **Objetivos y justificación del trabajo.**

Los objetivos de este trabajo se basan en desarrollar un andamio biocompatible, biodegradable y bioactivo, con unas propiedades mecánicas compatibles con el tejido óseo, y que pueda ser fabricado de a medida del paciente de forma fácil rápida y económica.

De este modo, se han elegido los polímeros policaprolactona (PCL) y ácido poliláctico (PLGA) y la cerámica hidroxiapatita (HA), gracias a la biocompatibilidad que aporta. Por un lado, estos polímeros presentan unas adecuadas propiedades mecánicas junto con una biodegradabilidad ajustable a partir de la mezcla de éstos. Por otro, la hidroxiapatita aporta la bioactividad carente en estos primeros, favoreciendo la osteogénesis.

Por otro lado, es necesario una tecnología de fabricación que tenga capacidad de realizar las distintas geometrías y morfología estructural (control tamaño de poros, porosidad interconectada, etc.) a medida que se requieran en cada caso individual, permita un fácil diseño del andamio, sea de rápida fabricación, poco costosa y compatible con materiales que presenten los requisitos comentados.

Así, se eligió enfocar la obtención de estos andamios a partir de la tecnología de fabricación por adición (prototipado rápido), gracias al grado de personalización que presentan, en especial la impresión 3D de modelado por deposición fundida (FDM). Esta tecnología no sólo aporta bajos tiempos y costos de fabricación sino también una fácil personalización y diseño del andamio.

Se comprobó la idoneidad de esta tecnología para cumplir con los requisitos de índole estructural mediante la impresión con ácido poliláctico (PLA), muy usado en esta tecnología, verificando la capacidad de esta y dando paso a la búsqueda de materiales aplicables en ámbito médico.

Es por ello que se ha decidido desarrollar filamentos de estos materiales compatibles con la tecnología de impresión 3D FDM. Esto ha sido posible gracias a la puesta a punto de una extrusora que permite conformar el material. Posteriormente, se diseñó e imprimió probetas con una estructura porosa y geometría normalizada para su posterior caracterización mecánica.

Como línea futura, gracias a los equipos de imagen ya presentes en los hospitales, las características de esta tecnología permitiría realizar cirugías más exacta con una positiva reducción de los tiempos y posibles inconvenientes de la misma (Ilustración 11).

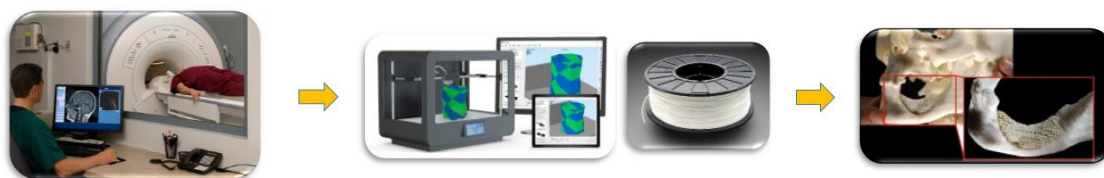


Ilustración 11. Idea futura de esta aplicación. Adquisición de defecto óseo con tecnología de imagen. Diseño del defecto e impresión del andamio. Cirugía [16,17,18].

2 Validación de la idoneidad de la tecnología de impresión mediante deposición de material fundido en la fabricación de andamios porosos poliméricos.

2.1 Objetivos

Este apartado tiene como objetivo principal determinar la idoneidad de la tecnología FDM en la fabricación de andamios para tejidos. Para ello se evaluará la capacidad para generar estructuras porosas que cumplan los siguientes requisitos:

- Capacidad de controlar el tamaño de poro. Necesario para favorecer el crecimiento del tejido óseo a través del andamio ($\approx 400 \mu\text{m}$ para tejido óseo, [19])
- Capacidad de controlar la organización de los poros.
- Capacidad de generar estructuras con geometrías complejas.

2.2 Métodos y materiales

Para todas las pruebas se empleó una impresora 3D cartesiana no comercial (<https://github.com/prusa3d/Original-Prusa-i3>) controlada mediante el firmware Marlin (versión 1.1.6, <http://marlinfw.org/>). Los archivos de control numérico G-code fueron generados mediante el software Cura (versión 3, Ultimaker B.V., Holanda).

Como material modelo, se empleó filamento comercial de ácido poliláctico de 1.75 mm (BQ, España) tanto natural como con colorante blanco.

Generalmente los software de generación de g-code para impresión FDM generan un fichero que imprime una pared densa y un relleno poroso, a fin de ahorrar material y minimizar las contracciones de la pieza al enfriarse. Es por esto, que es posible generar piezas completamente porosas a partir de modelos sólidos empleando este tipo de software. Para ello se ajustaron las siguientes variables en Cura:

- **Altura de capa:** Determina el espesor de cada capa de impresión. Permite controlar el tamaño de poro en Z.
- **Grosor de la pared:** Determina el espesor de la pared. Fijando este valor en 0, las paredes laterales desaparecen.
- **Grosor superior:** Determina el espesor de la pared superior. Fijando este valor en 0 esta pared desaparece.
- **Grosor inferior:** Determina el espesor de la pared inferior. Fijando este valor en 0 esta pared desaparece.
- **Patrón de relleno:** Determina la organización de las líneas que generan el patrón de relleno. Fijando este valor en líneas, el relleno se genera mediante una estructura de barras separadas una determinada distancia, y que varían su dirección en cada capa.
- **Direcciones de línea de relleno:** Determina los ángulos del patrón de líneas que se alternan en cada capa.
- **Distancia de línea de relleno:** Determina la separación entre las diferentes líneas del relleno. Permite controlar el tamaño de poro en XY.
- **Porcentaje de superposición del relleno:** Determina el porcentaje de superposición del patrón de relleno sobre la pared sólida. Al fijar el valor de pared en cero, se fijará este valor en 100% con el objetivo de mantener la estabilidad dimensional.

2.2.1. Control sobre el tamaño de poro.

Para comprobar la posibilidad de controlar el tamaño de poro, se imprimieron probetas de 10x10x3 mm variando los parámetros según se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

	50 μm	100 μm	200 μm	300 μm	400 μm
Altura de capa	0.05	0.1	0.2	0.15	0.2
Grosor de la pared	0	0	0	0	0
Grosor superior	0	0	0	0	0
Grosor inferior	0	0	0	0	0
Patrón de relleno	Líneas	Líneas	Líneas	Líneas	Líneas
Direcciones de línea de relleno	0°, 90°	0°, 90°	0°, 90°	0°, 0°, 90°, 90°	0°, 0°, 90°, 90°
Distancia de línea de relleno	0.45	0.5	0.6	0.7	0.8
Porcentaje de superposición del relleno	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 1. Parámetros en función del tamaño de poro.

Debido a los problemas de adhesión entre capas que aparecen al emplear espesores mayores de 300 μm , en las probetas con poro de 300 y 400 μm en Z se optó por realizar capas de 150 y 200 μm respectivamente, variando la dirección dl patrón de relleno cada dos capas.

2.2.2. Control sobre la organización de poros

Para analizar la capacidad de controlar el tamaño de poro se empleó un modelo basado en la superposición de barras desfasadas 90°. Sin embargo, este tipo de estructura confiere una alta anisotropía mecánica a las piezas.

Para estudiar la posibilidad de generar estructuras porosas con mayor isotropía, se generaron probetas de 10x10x3 mm con barras desfasadas a diferentes ángulos: 90°, 45°, 30° y 20°. Se emplearon como valores fijos una altura de capa de 200 μm , y una distancia de línea de 800 μm . A continuación, se analizó la estructura mediante microscopía óptica.

2.2.3. Capacidad para generar estructuras porosas huecas

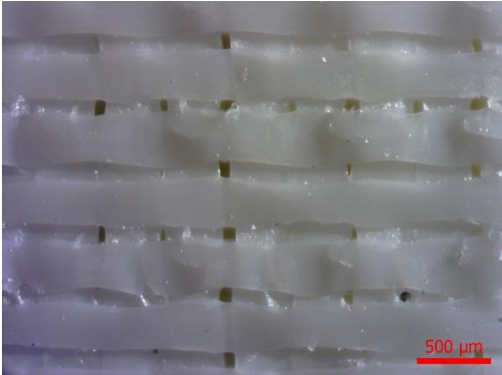
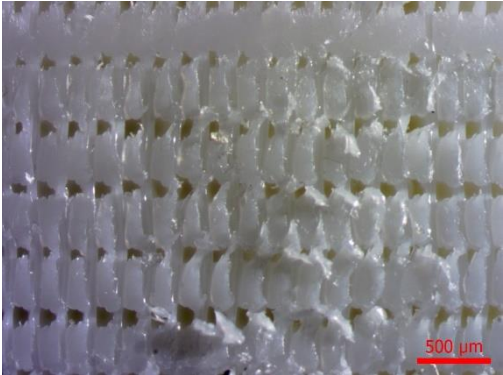

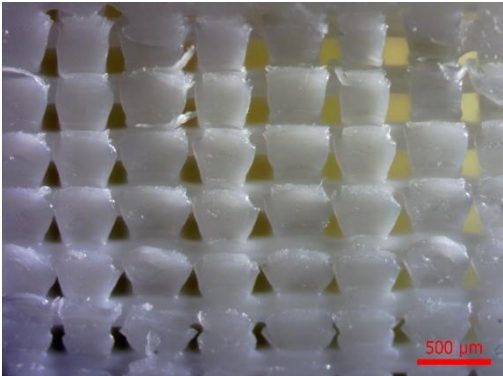
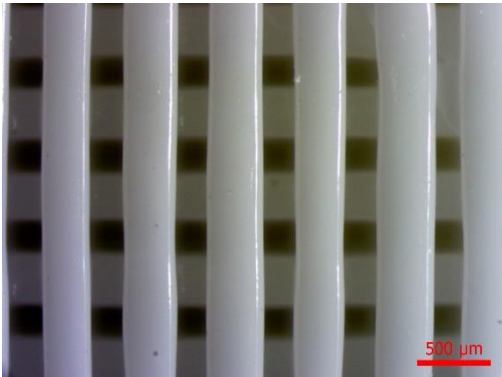
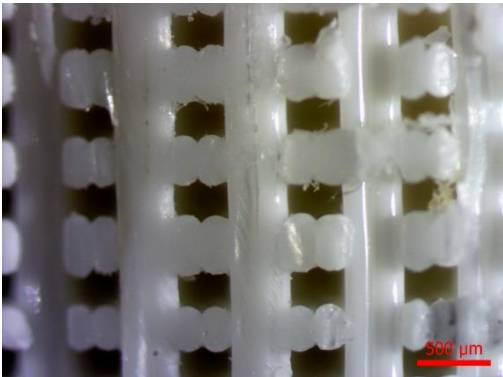
Se imprimieron diversas piezas porosas con geometrías complejas y se analizaron mediante inspección visual para comprobar posibles defectos e imperfecciones.

Para estas piezas, se emplearon los siguientes parámetros:

- **Altura de capa:** 200 μm
- **Grosor de la pared:** 0
- **Grosor superior:** 0
- **Grosor inferior:** 0
- **Patrón de relleno:** Líneas
- **Direcciones de línea de relleno:** 0, 45, 90, 135
- **Distancia de línea de relleno:** 800 μm
- **Porcentaje de superposición del relleno:** 100%

2.3 **Resultados y discusión**

2.3.1. Control sobre el tamaño de poro.

Poro (μm)	XY	Z
50		
100		
200		

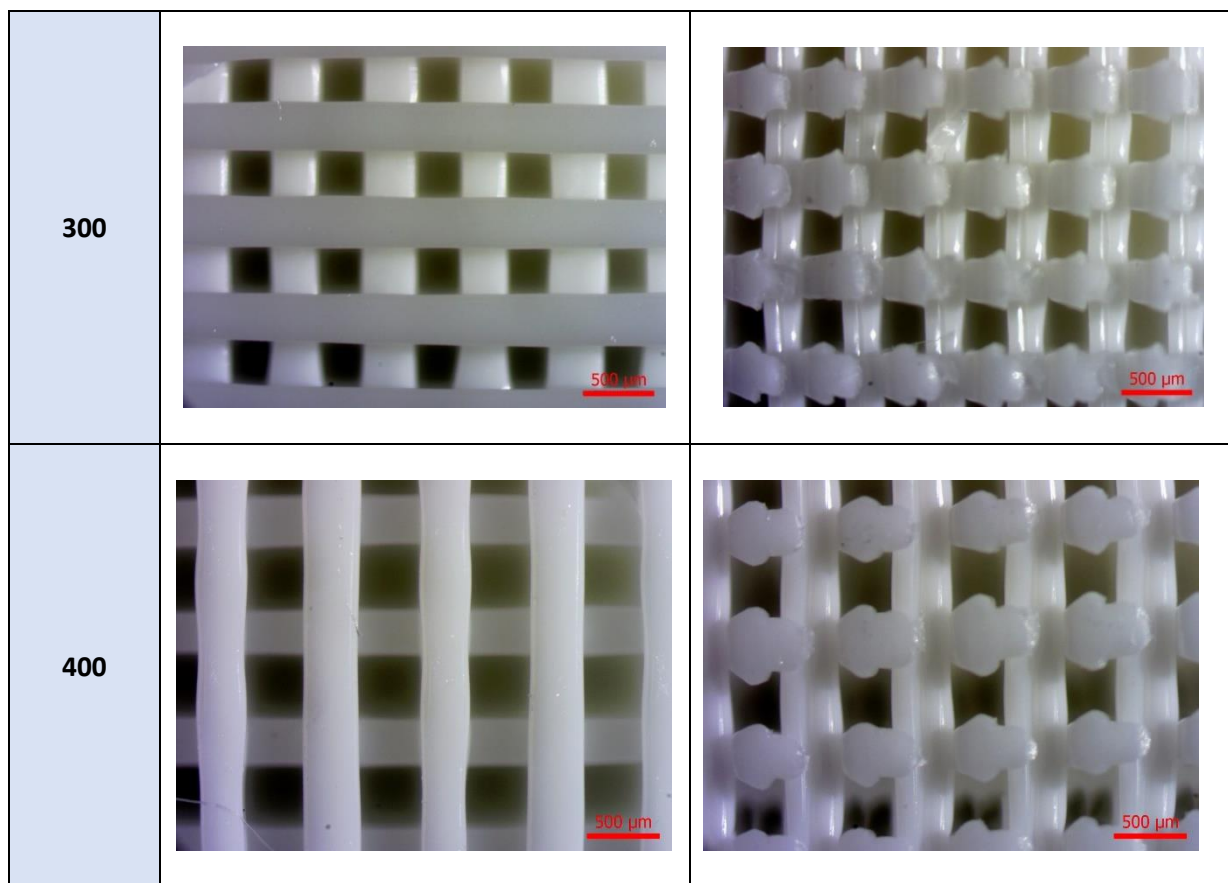


Tabla 2. Micrografías de los poros en los planos XY y XZ.

Se puede observar cómo es posible crear andamios con poros regulares interconectados, desde 50 μm en adelante, sin embargo por debajo de 100 μm , la homogeneidad y regularidad de los poros cae drásticamente.

2.3.2. Control sobre la estructura de poro.

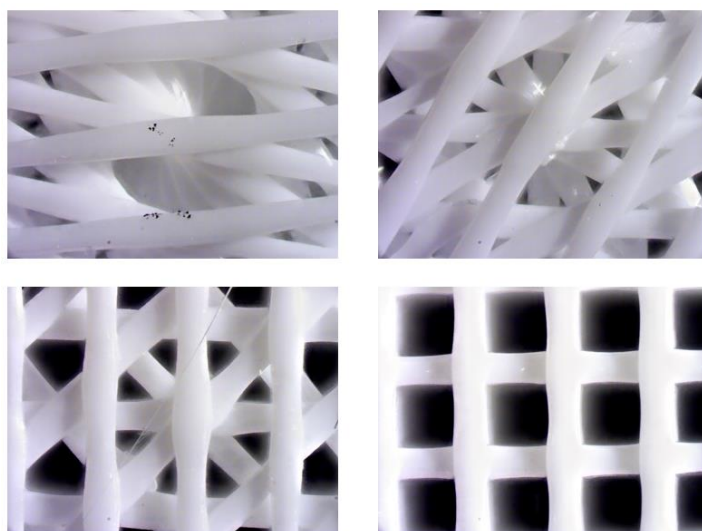


Ilustración 12. Micrografías de estructuras generadas (stack de enfoque en Z) a 20°, 30°, 45° y 90°.

En la Ilustración 12 se puede observar cómo la variación del ángulo de las fibras permite conseguir distintas configuraciones de poro.

2.3.3. Capacidad para generar estructuras porosas huecas



Ilustración 13. Impresión con PLA de formas complejas. a,b) Maxilar inferior con defecto cubierto por andamio; c) Andamio para defecto maxilar; d) geometría entrelazada; e) cóndilo del fémur.

Para determinar la capacidad de realizar formas complejas, se imprimieron una serie de piezas de geometría irregular, de las mismas características que las anteriores. Así, se comprobó con objetos como un cóndilo de un fémur, una geometría entrelazada e incluso con la simulación de un defecto maxilar, la capacidad de esta tecnología para la fabricación de piezas complejas porosas (Ilustración 13).

Una vez comprobada la capacidad de la impresión 3D de tecnología FDM para cubrir los requisitos estructurales de nuestro andamio, se dispuso a realizar la misma estructura con otros materiales adecuados para aplicaciones médicas. De esta forma tendríamos cubiertas las necesidades estructurales y de material.

3 Extrusión de filamentos de PCL, PCL-PLGA, PCL-HA y PCL-PLGA-HA

3.1 Objetivos

El objetivo es obtener un material en forma de filamento con unas condiciones de flexibilidad, viscosidad y rigidez suficientes para su correcta aplicación en impresión 3D FDM, para la fabricación de andamios óseos.

Dado el buen comportamiento que presenta la policaprolactona (PCL) para su empleo en impresión 3D (J. Korpela et al., 2013 y E. Nyberg et al., 2017) y a cualidades como su biocompatibilidad y biodegradabilidad (alrededor de 3 años), se decidió realizar filamentos con distintas concentraciones de hidroxiapatita (HA), encargada de aportar la bioactividad carente en el polímero por sí solo. Así, se realizaron compuestos de PCL con distintas concentraciones de HA (0, 10, 20, 40 wt. %).

Por otro lado, el empleo de PLGA se justifica debido a la gran inmersión que tiene este material en la ingeniería de tejidos gracias a sus buenas propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad (alrededor de 3 meses) y su aprobación por la FDA (*Food and Drug Administration*) como material de fabricación de muchos dispositivos aprobados.

En un principio, se hicieron pruebas para la realización de andamios compuestos únicamente de PLGA, pero su temperatura de transición vítrea, por encima de la temperatura ambiente ($\approx 45^{\circ}\text{C}$), convierte este material en inadecuado para esta aplicación. Temperaturas de transición vítrea por encima de la temperatura de trabajo de un polímero, hace de este un estado vítreo, rígido y frágil, y, en caso contrario, el polímero se torna blando y flexible.

Observadas las buenas propiedades que aporta el PCL tanto para la extrusión de filamento, y las buenas propiedades comentadas anteriormente del PLGA. Se optó por realizar un *blend* formado por PCL-PLGA, y otro por PCL-PLGA-HA. Además, este *blend* mejora la gran elasticidad del PCL en su impresión 3D, siendo una desventaja en la fabricación de los andamios.

3.2 Métodos y materiales

a) Preparación de los pellet de PCL-HA, PCL-PLGA y PCL-PLGA-HA

La preparación de los pellets de PCL-HA, para su posterior extrusión, se realizó a partir de la disolución en 25 ml de diclorometano (DCM) de 27 g de PCL (pellets, Mw. 45000 Da, Sigma Aldrich) dejándolo en agitación durante 3 horas hasta su disolución completa. Por otro lado, se dispersó 3 g de HA (nanopartículas < 200 nm, Sigma Aldrich) en el mismo disolvente durante 2 horas. Por último se mezclaron ambas disoluciones y se dejaron en agitación durante 24 horas hasta la evaporación completa del disolvente. Finalmente el compuesto sólido obtenido se trituró con un molinillo de café para obtener los pellets correspondientes (Ilustración 14).

De la misma forma se realizaron compuestos de PCL-HA al 20% (24 g de PCL y 6 g de HA) y al 40% (18 g de PCL y 12 g de HA) en peso.

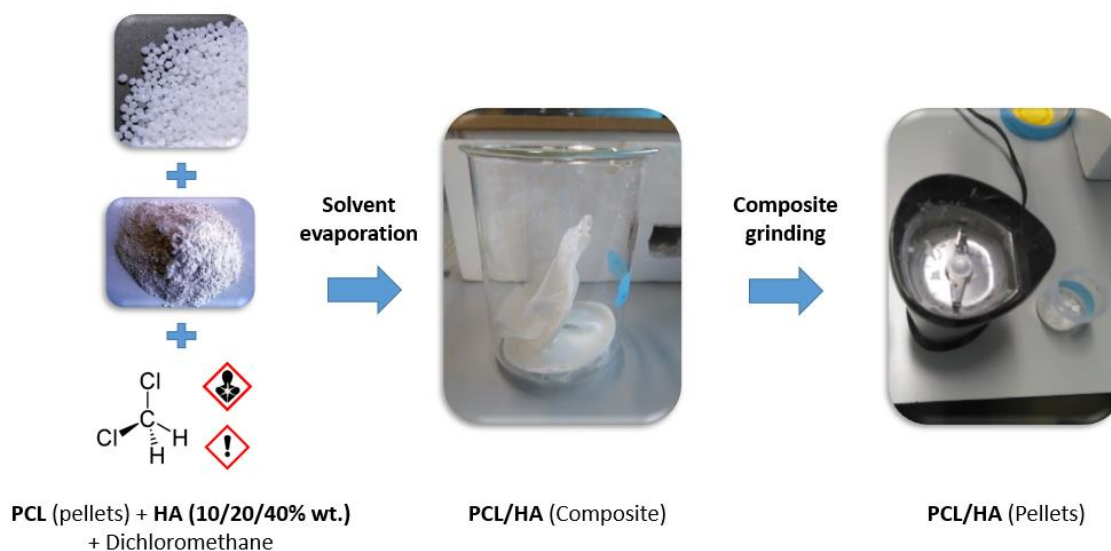


Ilustración 14. Procedimiento de síntesis del compuesto PCL-HA.

Para la preparación de los pellets de PCL-PLGA (50-50 %) se disolvieron 15 g de PLGA (Resomer RG 502 H 50:50, polvo, Mw. = 7000 - 17000 Da, Evonik) en 12 ml de diclorometano (DCM) y por otro lado, 15 g de PCL (pellets, Mw. 45000 Da, Sigma Aldrich) disueltos en 12 ml del mismo disolvente y se dejaron en agitación durante 3 horas hasta su disolución completa.

En el caso PCL-PLGA-HA (30-30-40 %), se realizó el mismo proceso anterior con 9 g de PCL y 9 g de PLGA. Se dispersaron también 12 g de HA en 12 ml de DCM durante 2 horas. Por último se mezclaron todas las disoluciones en agitación durante 24 horas hasta la evaporación completa del disolvente. Una vez evaporado el disolvente, obtenemos un compuesto en bruto, el cual fue convertido en pellets a partir de su trituración.

b) Extrusión de los materiales resultantes:

Una vez obtenidos los pelles de los diferentes materiales se hace necesario buscar la compatibilidad con la tecnología a tratar (FDM) por lo que es necesario obtener un filamento flexible y resistente que permita su manejo e impresión.

La extrusión es un proceso de compresión en el que el material fundido (o viscoelástico) es forzado a fluir a través de un orificio de troquel para proporcionar un producto largo y continuo por la acción giratoria de un husillo (Ilustración 15). El proceso se divide en varias zonas:

- Zona de alimentación: el material es introducido al interior de la cámara donde se encuentra el tornillo.
- Zona de compresión: el material es calentado disminuyendo su viscosidad y comprimido.
- Zona de dosificación: el material comprimido se dirige hacia la boquilla para conformarse.

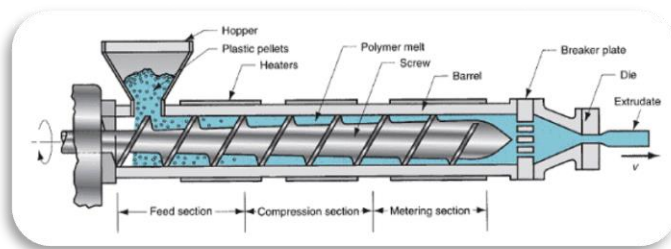


Ilustración 15. Proceso de extrusión [20].

Para ello se fabricó una extrusora (Ilustración 16, véase Anexo) encargada de realizar filamentos de aproximadamente 1,8 mm de diámetro y 30 cm de longitud.



Ilustración 16. Extrusora de filamento.

Una vez con todo lo necesario para realizar el proceso de extrusión, se dispuso a fabricar los filamentos, donde se pueden diferenciar los siguientes pasos:

- Ajuste de parámetros: cada material necesita la puesta a punto de los distintos parámetros de extrusión, entre los que destaca la temperatura del proceso. Los parámetros a destacar son (modificables desde la interfaz, véase Anexo):
 - T° de extrusión.
 - Tiempo/velocidad de extrusión.
 - Temperatura a la salida.

- Alimentación: los pellets del compuesto se introducen por la parte superior de la cámara. En su paso por la cámara calefactada el material es fundido y comprimido hasta el final del trayecto, donde se hace pasar por un orificio del diámetro deseado.
- Compresión: el material es fundido y comprimido a través de la cámara hasta llegar al orificio de salida, donde ocurre la formación del filamento.
- Enfriamiento del material: el filamento en su salida se hace pasar por una corriente de aire proporcionada por un ventilador y, posteriormente, se recoge en un baño de agua, asegurando un enfriamiento adecuado para mantener su consistencia.

Como se ha comentado, para una correcta extrusión fue necesaria la puesta a punto de los parámetros para cada material, siendo la temperatura de extrusión uno de los más importantes. En la Tabla 3, se puede observar las temperaturas de extrusión empleadas en cada material.

Material	Temperatura de Extrusión (°C)
PLA (filamento comercial)	N/A
PCL	65
PCL – HA (10 wt. %)	68
PCL – HA (20 wt. %)	70
PCL – HA (40 wt. %)	72
PCL – PLGA (50/50 %)	65
PCL - PLGA – HA (30/30/40 %)	74

Tabla 3. Temperaturas de extrusión de cada material.

Para los distintas concentraciones de HA se espera la necesidad de una mayor temperatura de extrusión a mayores cantidades de ésta, debido a la viscosidad que aporta. Se obtuvieron así filamentos de cada compuesto preparados para su impresión.

c) Análisis termogravimétrico de los filamentos obtenidos.

Con el fin de comprobar las temperaturas de degradación y la homogeneidad en la distribución de la hidroxiapatita, se realizaron ensayos termogravimétricos (Q5000IR, TA Instruments) en tres pequeños fragmentos aleatorios de cada material.

3.3 Resultados y discusión

Los análisis termogravimétricos permiten comprobar la temperatura de degradación del polímero, como la cantidad de HA en cada uno de los compuestos. En las gráficas se observa cómo a partir de 250 °C el polímero comienza a degradarse, disminuyendo su masa, habiéndose completado este proceso en todos los compuestos a partir de unos 500 °C (Ilustración 17). En ese momento la masa resultante es aquella correspondiente a la HA, con una temperatura de degradación mucho mayor. Este análisis ha sido realizado para todas las muestras de cada compuesto.

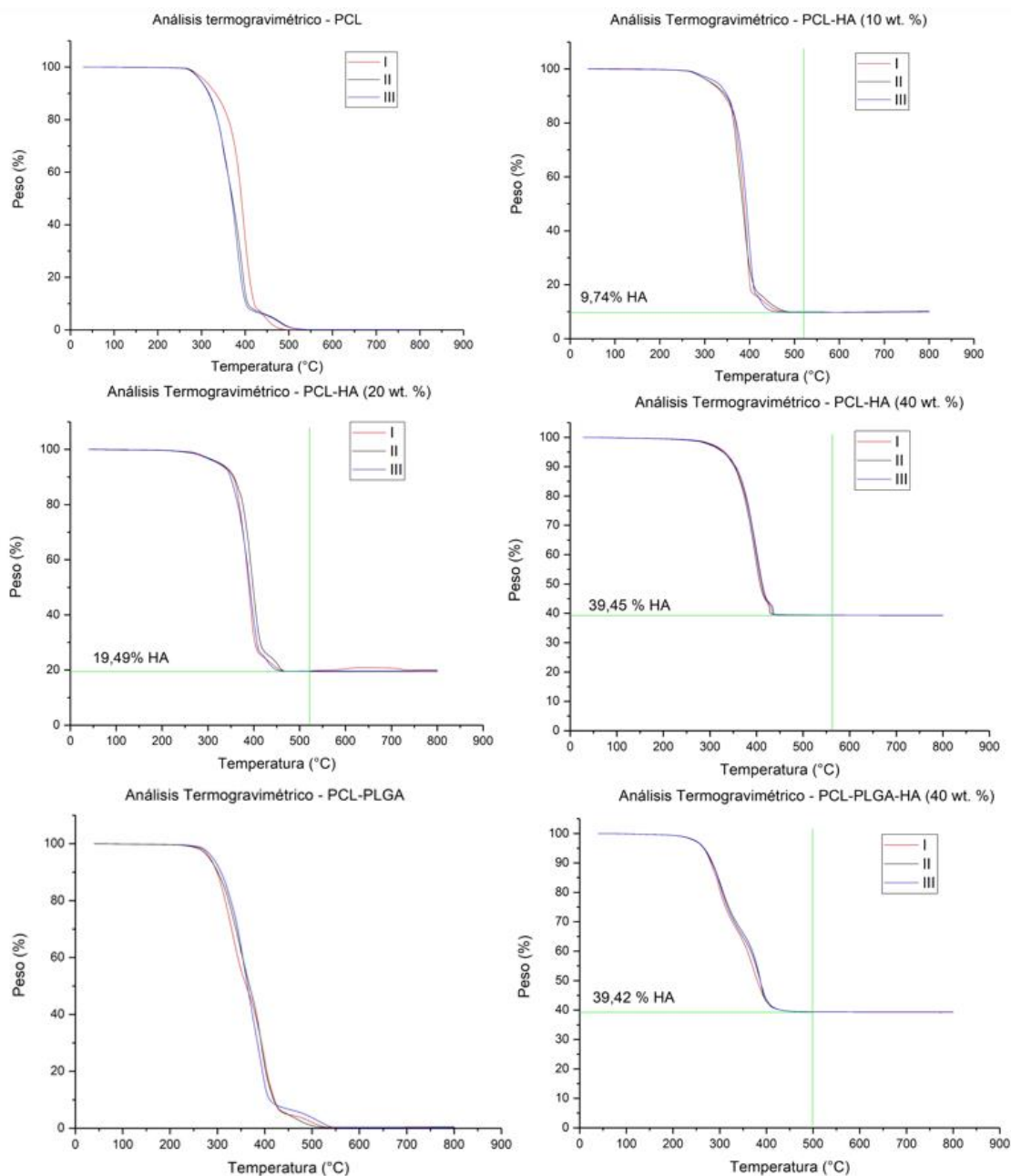


Ilustración 17. Análisis termogravimétrico de las muestras (I, II, III) de cada material.

Cabe destacar la importancia de la temperatura de comienzo de la degradación del polímero (250 °C), pues es determinante para conocer las temperaturas de extrusión e impresión futuras que eviten dañarlo.

Es necesario conocer estos parámetros ya que las nanopartículas de HA pueden precipitar en su síntesis, por ser un material inorgánico en un fluido y tener distinta densidad, entorpeciendo la homogeneidad de ésta en el compuesto. En la Tabla 4 siguiente se puede observar la media de concentración de HA y de polímero en cada una de las muestras es adecuada, y la distribución de HA es notablemente homogénea a lo largo de los filamentos.

	Muestras	I (% peso)	II (% peso)	III (% peso)	MEDIA	DESVIACIÓN
PCL-HA 10 wt. %	PCL	89,67	89,70	89,58	89,65	0,06
	HA	9,74	9,75	9,91	9,80	0,10
PCL-HA 20 wt. %	PCL	79,75	79,59	79,56	79,63	0,10
	HA	19,49	19,44	19,61	19,51	0,09
PCL-HA 40 wt. %	PCL	59,75	59,64	59,72	59,70	0,06
	HA	39,45	39,41	39,41	39,42	0,02
PCL-PLGA-HA 40 wt. %	PCL-PLGA	59,98	60,02	60,02	60,01	0,02
	HA	39,42	39,37	39,37	39,39	0,03

Tabla 4. Media del % en peso de HA en cada compuesto.

4 Impresión de andamios porosos de PCL, PCL+PLGA, PCL+HA y PCL+PLGA+HA

4.1 Objetivos

Una vez obtenidos los filamentos para cada uno de los compuestos (PCL-HA 10/20/40 % wt., PCL-PLGA y PCL-PLGA-HA) se imprimieron probetas porosas normalizadas para ensayo mecánico, con el fin de analizar su viabilidad para su uso como andamios óseos. Este ensayo, como se verá posteriormente, consistirá en una caracterización a tracción, flexión y compresión, siendo necesarias 5 probetas para cada caso, con una geometría de probeta determinada en base a las normas UNE-EN ISO 527-2 (Anexo A), UNE-EN ISO 178 (ap. 6) y UNE-EN ISO 604 (Anexo A) correspondientes a la determinación de las propiedades de plásticos en tracción, compresión y flexión respectivamente.

4.2 Métodos y materiales

4.2.1. Impresión de probetas normalizadas para ensayos de tracción, compresión y flexión por tres puntos.

Las dimensiones de las probetas de tracción y compresión se corresponden con la tipología de probetas pequeñas 1BA (Ilustración 18) y en el caso de compresión, con probetas pequeñas de tipo 1 (Ilustración 19). La selección de probetas pequeñas es debido a la limitación en la cantidad de material. Así, para la consecución de la impresión del andamio se realizaron los siguientes pasos:

- 1- **Diseño de la geometría:** diseño de las probetas con el software Autodesk Fusion 360 (Ilustración 18 e Ilustración 19) en base a la normativa para, posteriormente con el software *Ultimaker Cura®*, diseño de la estructura porosa, que vendrá determinada por el patrón de impresión de las fibras.

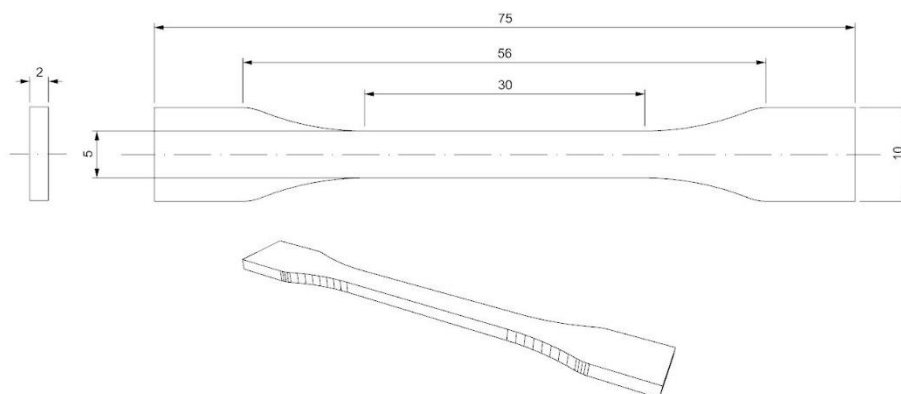


Ilustración 18. Diseño probeta tipo 1BA.

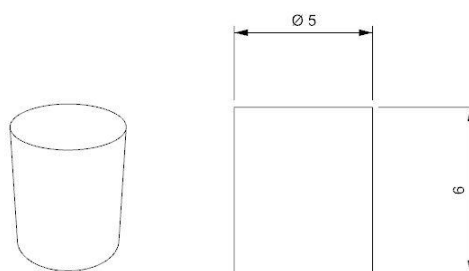


Ilustración 19. Diseño probeta de compresión tipo 1.

2- **Parámetros para la estructura porosa:** para conseguir la estructura con una porosidad e interconexión de poros deseada se empleó el software Cura (versión 3, Ultimaker B.V., Holanda), configurándose los parámetros siguientes (Ilustración 20):

- **Altura de capa:** 200 μm
- **Grosor de la pared:** 0
- **Grosor superior:** 0
- **Grosor inferior:** 0
- **Patrón de relleno:** Líneas
- **Direcciones de línea de relleno:** 0, 45, 90, 135 (Ilustración 21).
- **Distancia de línea de relleno:** 800 μm
- **Porcentaje de superposición del relleno:** 100%

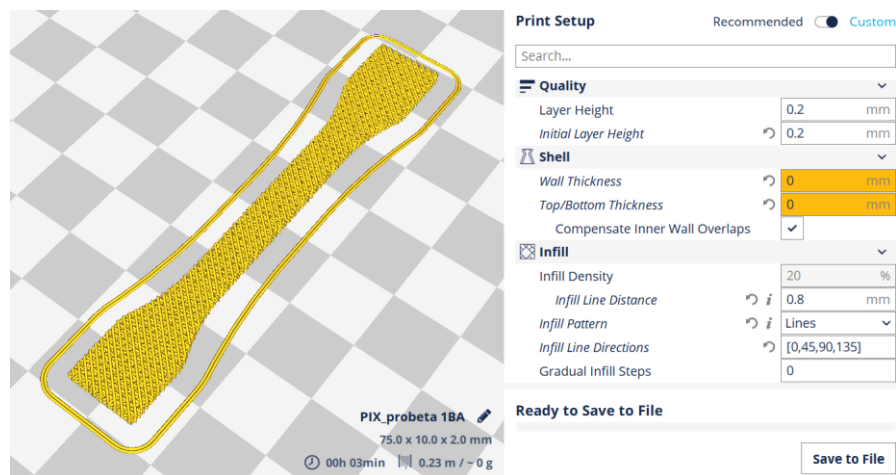


Ilustración 20. Determinación de parámetros para estructura porosa.

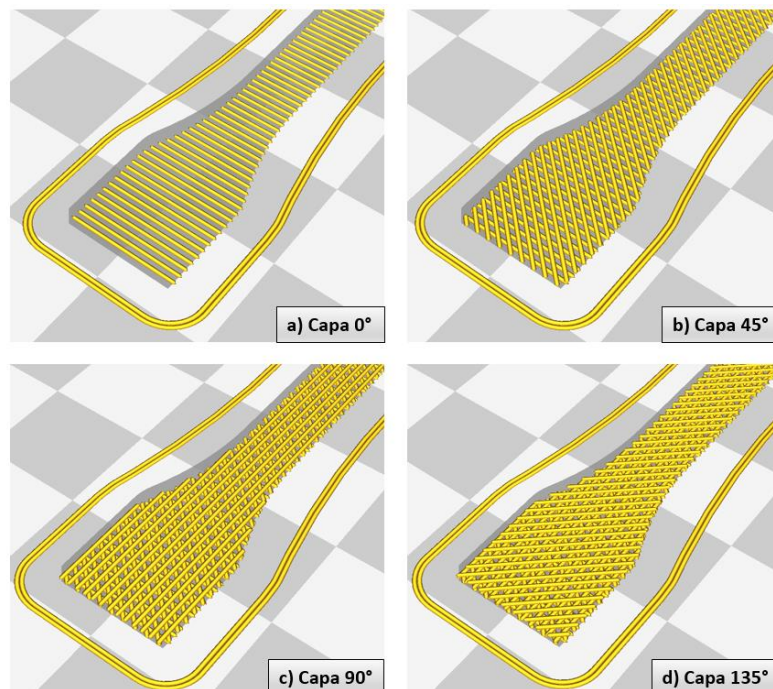


Ilustración 21. Capas del andamio a 0°, 45°, 90° y 135°.

Cabe destacar la facilidad de uso del software para el diseño del andamio, el cual quedaría preparado y listo para imprimir en poco tiempo (orden de 5 minutos).

- 3- **Parámetros de impresión:** una vez preparado el fichero de impresión con CURA (formato libre *.gcode*), se cargó en la impresora 3D FDM, encargada de fabricar la probeta (Ilustración 22). Antes de realizar esta impresión se hace necesario cargar el archivo, calibrar y precalentar el cabezal de extrusión y, finalmente iniciar el proceso.

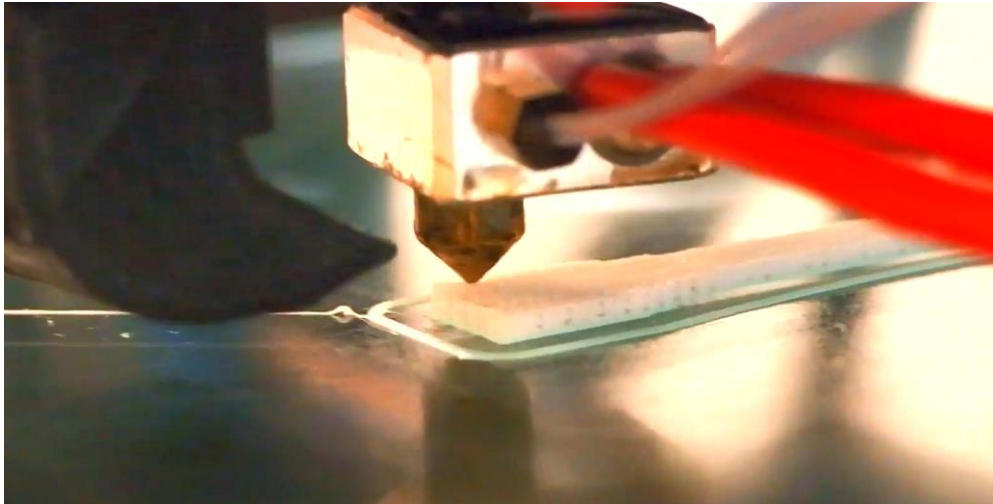


Ilustración 22. Impresión 3D de la probeta.

Se espera una buena compatibilidad de los filamentos extruidos con esta tecnología de impresión, de forma que el material presente la fluencia necesaria para una adecuada deposición de las fibras en las distintas capas de la probeta.

Los parámetros de impresión empleados, junto con la temperatura de extrusión de filamentos anteriores, se detallan en la Tabla 5:

Material	Temperatura Extrusión (°C)	Temperatura Impresión (°C)	Velocidad Impresión (mm/s)	Altura de capa (μm)	Tamaño poro XY (μm)
PLA (comercial filament)	N/A	200	30	200	400
PCL	65	160	30	200	400
PCL - HA (10 wt. %)	68	175	30	200	400
PCL - HA (20 wt. %)	70	175	30	200	400
PCL - HA (40 wt. %)	72	180	30	200	400
PCL - PLGA (50/50 %)	65	175	30	200	400

PCL - PLGA - HA (30/30/40 %)	74	190	30	200	400
--	----	-----	----	-----	-----

Tabla 5. Parámetros de impresión de los distintos materiales.

Una vez impresas las probetas, se descartaron para su caracterización mecánica las probetas de PCL-PLGA-HA (40 wt. %) debido a que eran demasiado frágiles para manipularlas.

4.2.2. Caracterización

Para comprobar la idoneidad de los materiales, se caracterizaron mecánicamente mediante ensayos de tracción, compresión y flexión por tres puntos. Estos ensayos se realizaron en base a las normas UNE-EN ISO 527-2, UNE-EN ISO 178 y UNE-EN ISO 604, correspondientes a la determinación de las propiedades de plásticos en tracción, compresión y flexión respectivamente.

Los ensayos se realizaron a una velocidad de 5 mm/min y, en el ensayo de flexión, con una distancia entre bridas de 50 mm en ambos ("L" en Ilustración 23).

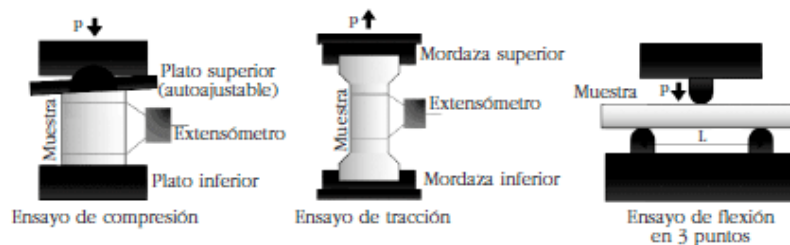


Ilustración 23. Ensayos de compresión, tracción y flexión (D. Guede et al., 2013).

Se ensayaron cinco muestras de cada compuesto, y a partir de los ensayos se extrajeron parámetros mecánicos como la rigidez, el límite elástico, la resistencia máxima y la ductilidad.

Esto se realizó mediante el uso de ecuaciones de resistencia de materiales como las que aparece en la Tabla 6.

Expresión	Explicación	Unidad
$\sigma = \frac{P}{A}$	Tensión unitaria (tracción y compresión)	[MPa = N/mm ²]
$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$	Alargamiento unitario, deformación	adimensional
$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$	Módulo de elasticidad (tracción y compresión)	[MPa = N/mm ²]
$\sigma = \frac{3PS}{2bh^2}$	Tensión unitaria (flexión)	[MPa = N/mm ²]
$E_f = \frac{S^3m}{4bh^3}$	Módulo de elasticidad (flexión)	[MPa = N/mm ²]
ΔL	Alargamiento medido	[mm]
L_0	Longitud inicial	[mm]
P	Carga aplicada	[N]
A	Sección transversal de probeta	[mm ²]
b	Ancho de probeta	[mm]
h	Espesor de probeta	[mm]
m	Pendiente de la curva fuerza-deflexión	[N/mm]
S	Distancia entre bridas	[mm]

Tabla 6. Expresiones para el cálculo de los parámetros mecánicos.

Una vez realizados los ensayos mecánicos, las probetas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de rayos X (SEM Inspect F50, FEI-Tecnai), con objeto de observar los puntos de fractura y a su vez observar la dispersión de la hidroxiapatita en el polímero.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1. Caracterización mecánica

A partir de los datos obtenidos en los ensayos mecánicos se obtuvieron las propiedades mecánicas de cada una de las probetas.

Ensayo de tracción

Gracias a las ecuaciones e la tabla 6, se representó para cada probeta su curva tensión-deformación (Ilustración 24), permitiendo así extraer cada uno de los parámetros:

- E (módulo de elasticidad): hace referencia a la rigidez del material, es la pendiente de la curva tensión-deformación en su parte lineal. Para ello se realizó una regresión lineal en esa zona obteniendo así un valor de pendiente con una buena aproximación.
- $\sigma_{\text{máx}}$ (tensión máxima): valor máximo de tensión que soporta el material.
- σ_y (límite elástico): zona que divide el comportamiento elástico y plástico del material. Este valor se obtiene a partir de la intersección de una línea paralela a la línea de ajuste de la curva, que pasa por un valor de deformación del 0.02 (adimens.) (Ilustración 25).
- $\epsilon_{\text{máx}}$ (deformación máxima): valor máximo que alcanza la deformación del material.

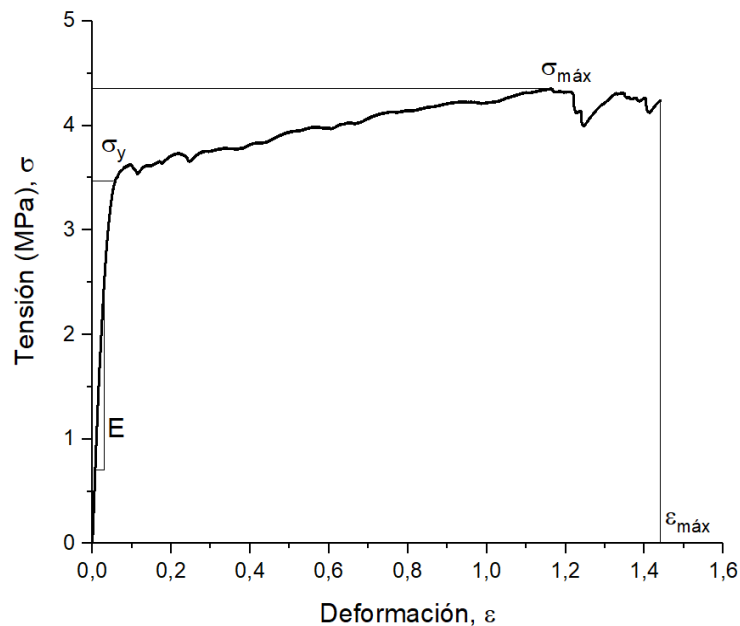


Ilustración 24. Curva tensión-deformación, ensayo de tracción.

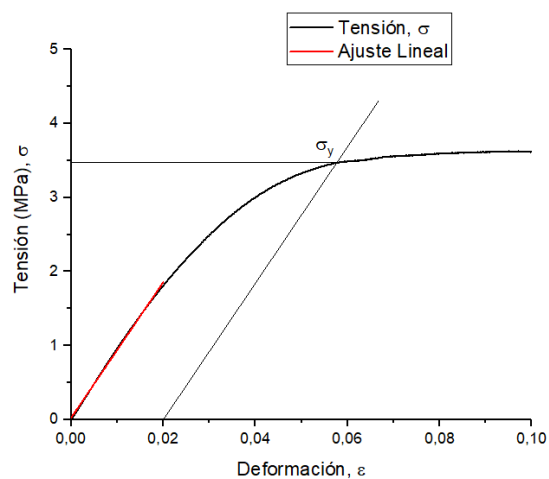
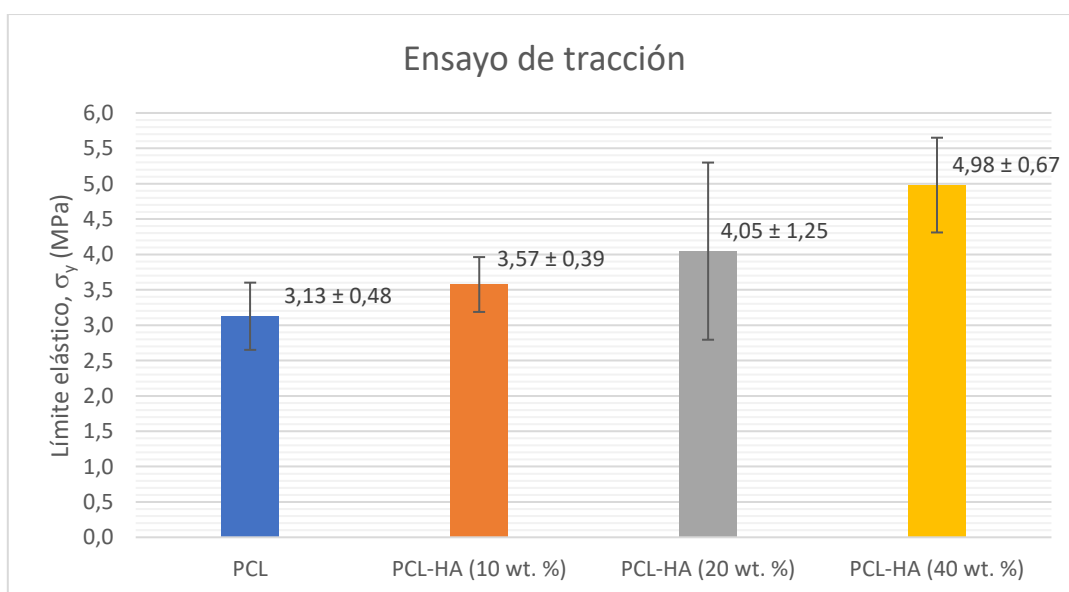
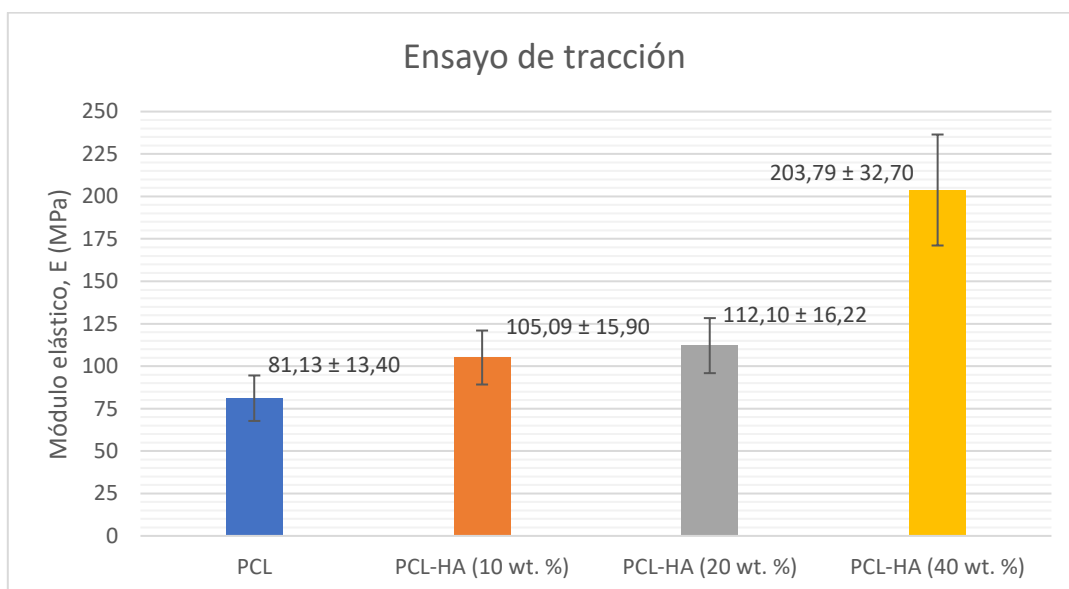
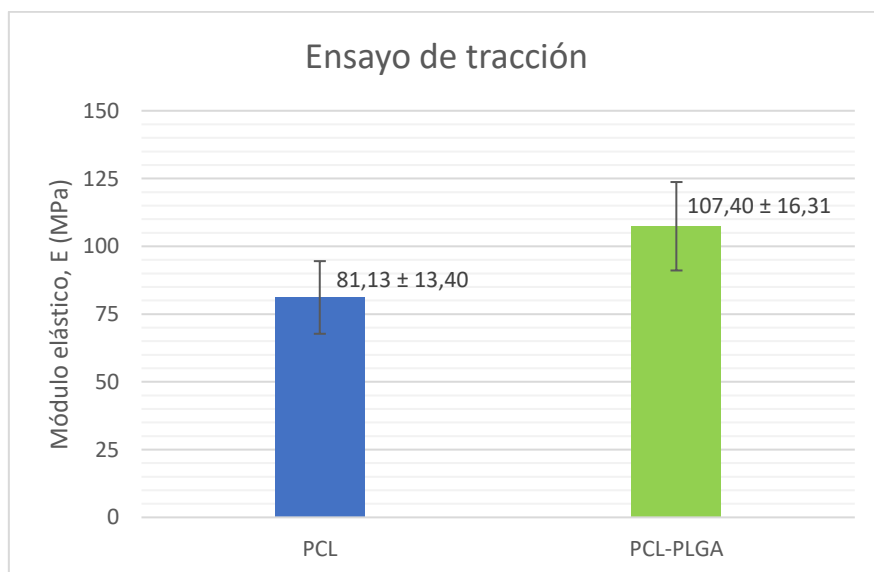
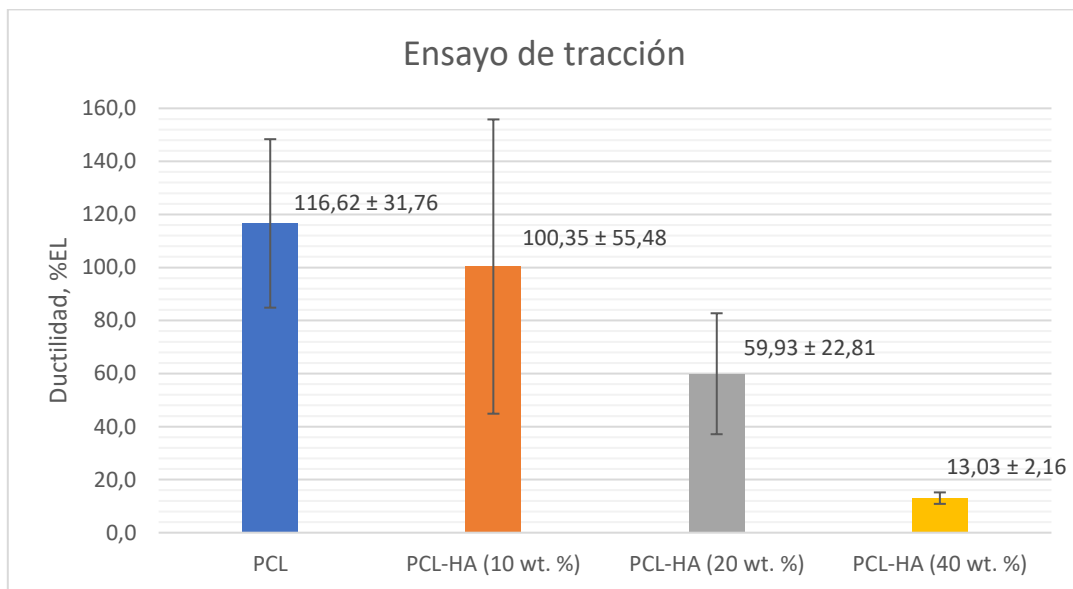
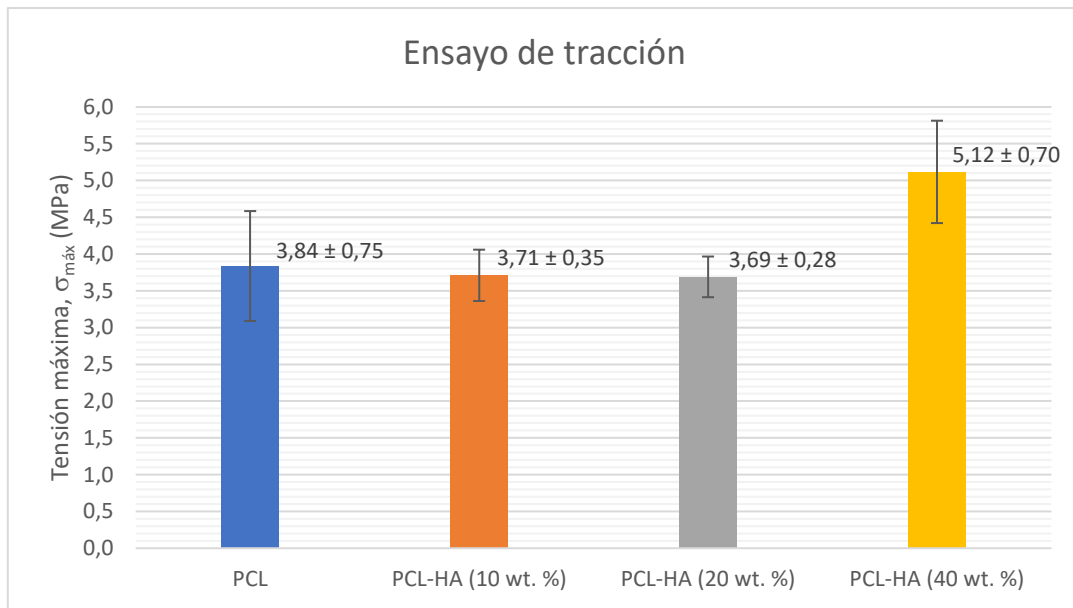
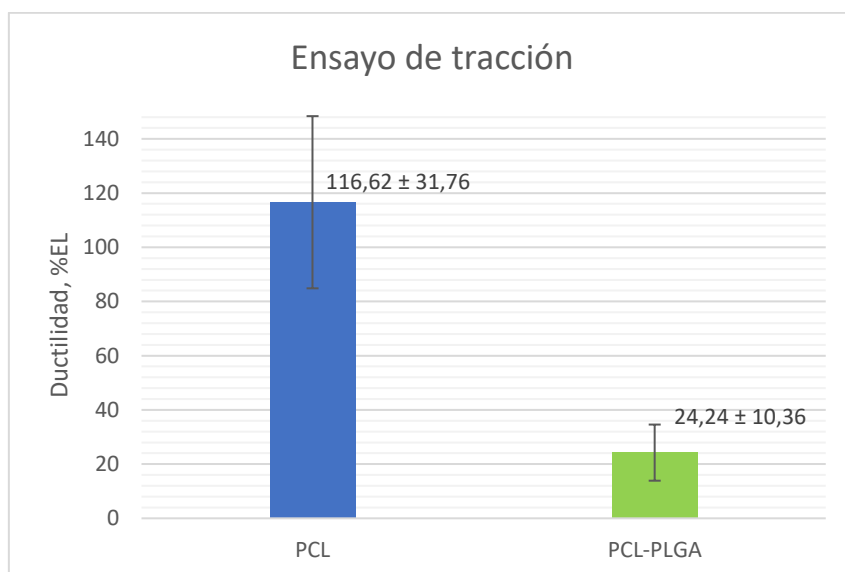
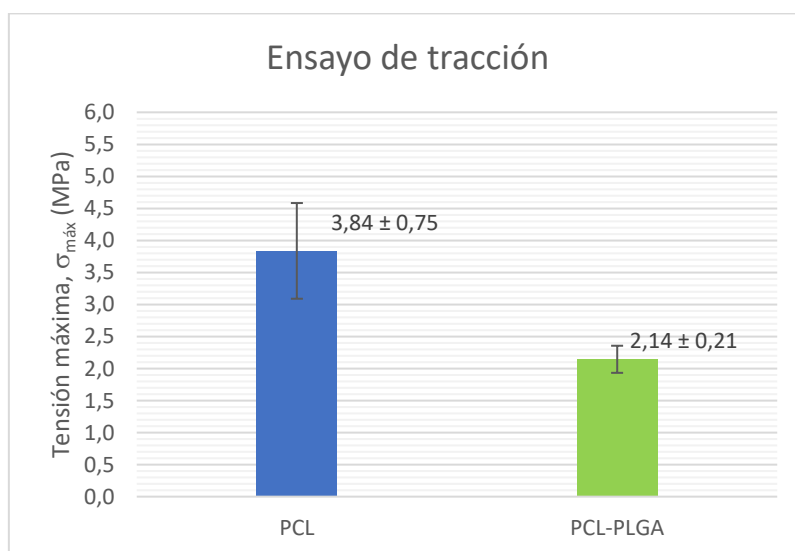
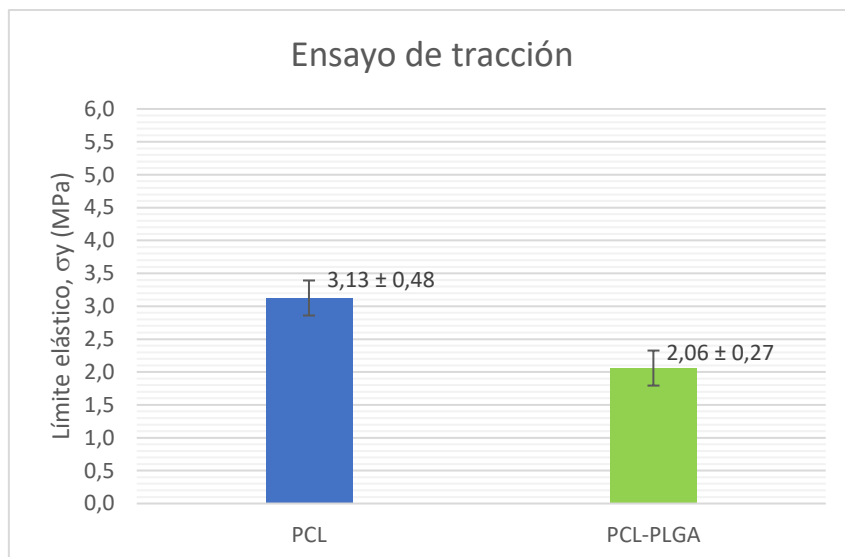


Ilustración 25. Ajuste lineal y definición del límite elástico (σ_y).

Resultados de tracción:







Ensayo de compresión

Como en el caso anterior, mediante el empleo de las ecuaciones de la tabla 6, se representó para cada probeta su curva tensión-deformación (Ilustración 26), permitiendo así extraer cada uno de los parámetros.

- E (módulo de elasticidad): hace referencia a la rigidez del material, es la pendiente de la curva tensión-deformación en su parte lineal. Para ello se realizó una regresión lineal en esa zona obteniendo así un valor de pendiente con una buena aproximación.
- σ_y (límite elástico): zona que divide el comportamiento elástico y plástico del material. Este valor se obtiene a partir de la intersección de una línea paralela a la línea de ajuste de la curva, que pasa por un valor de deformación del 0.02 (Ilustración 27).

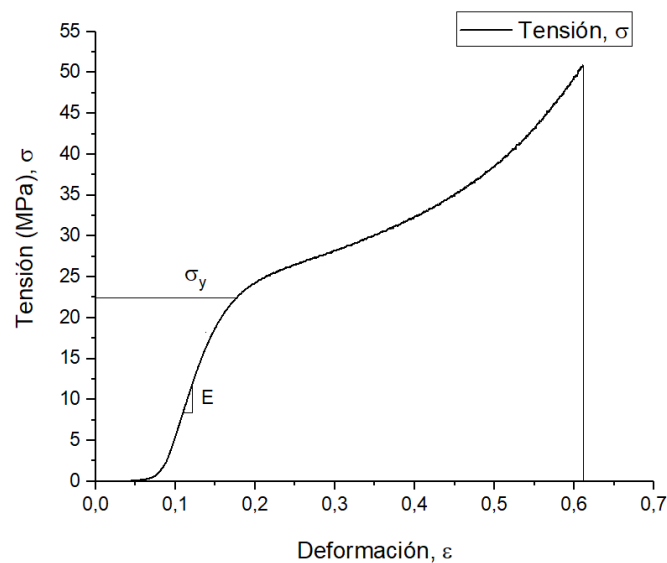


Ilustración 26. Curva tensión-deformación, ensayo de compresión.

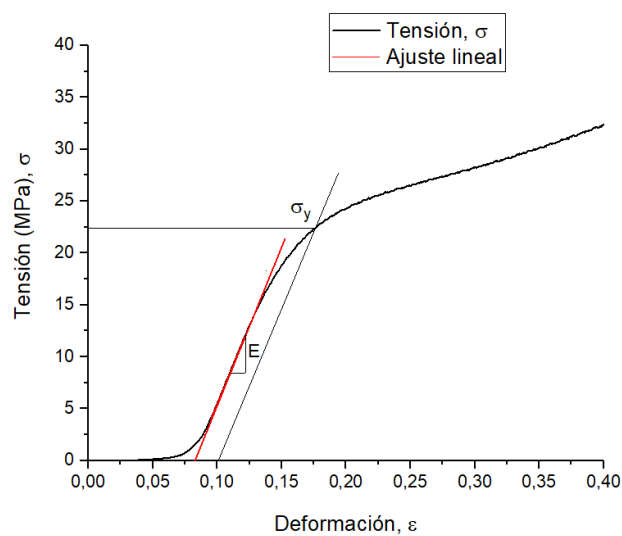
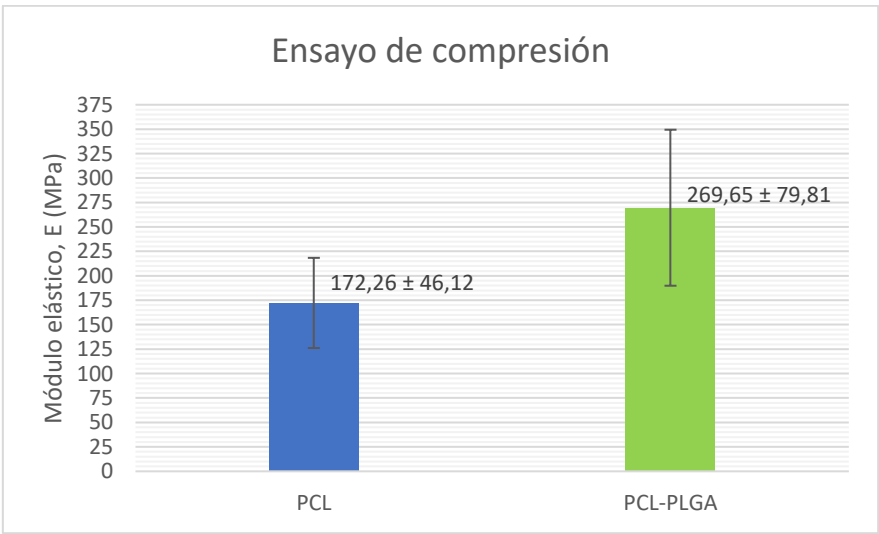
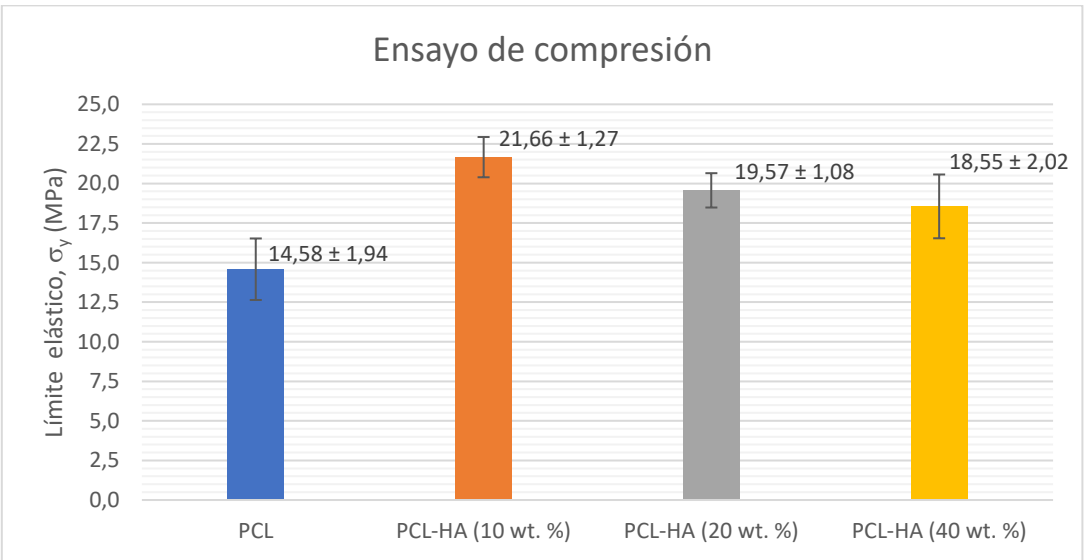
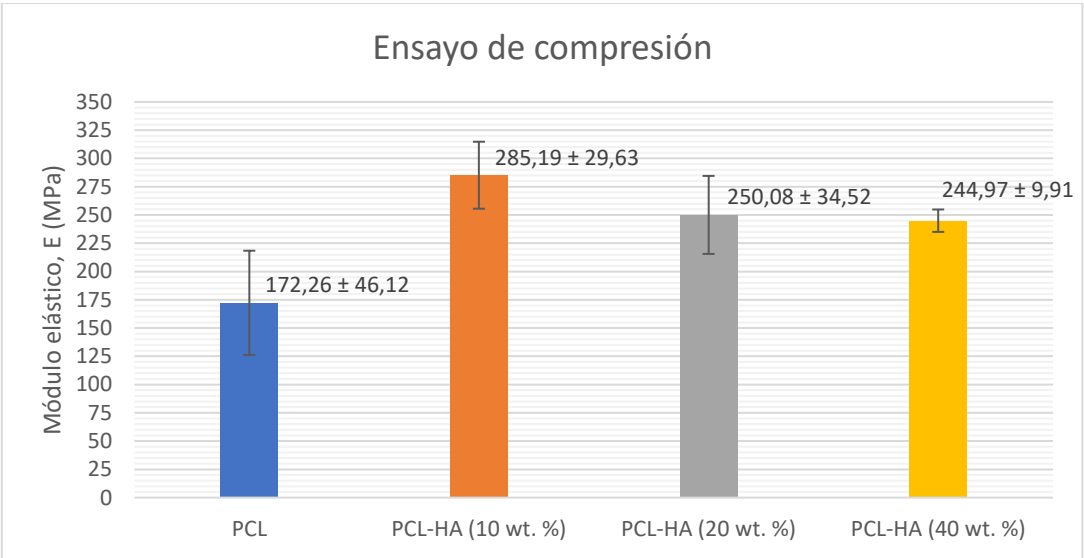
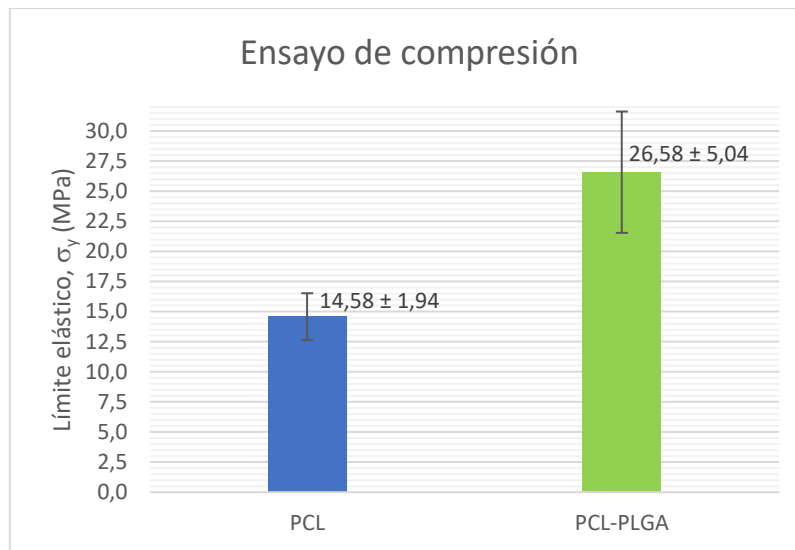


Ilustración 27. Ajuste lineal y definición del límite elástico (σ_y).

Resultados de compresión:





Ensayo de flexión

Gracias a los valores obtenidos en el ensayo, se representó la curva fuerza-extensión Ilustración 28, permitiendo así extraer estos parámetros:

- E_f (módulo de elasticidad a flexión): hace referencia a la rigidez del material a flexión. Para su cálculo se empleó la ecuación de la Tabla 6, siendo necesaria la pendiente de la curva fuerza-deflexión. Para ello se realizó una regresión lineal en esa zona obteniendo así un valor de pendiente con una buena aproximación.
- $\sigma_{m\acute{a}x}$ (tensión máxima): valor máximo de tensión a flexión que soporta el material.

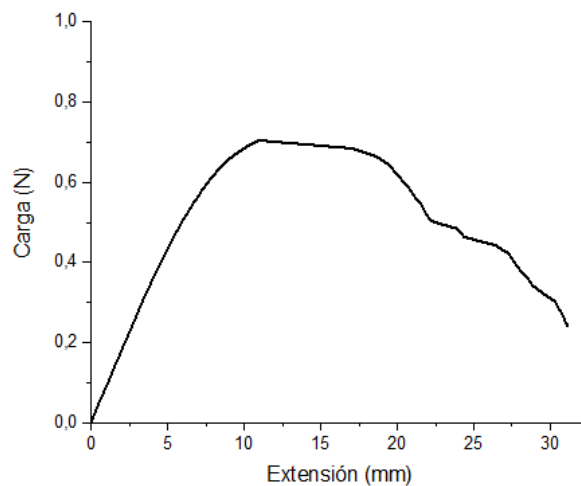
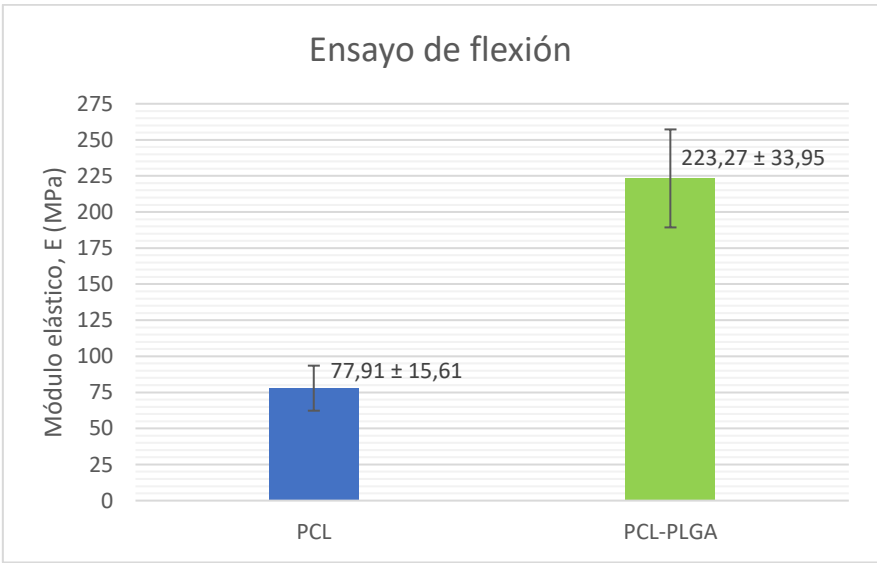
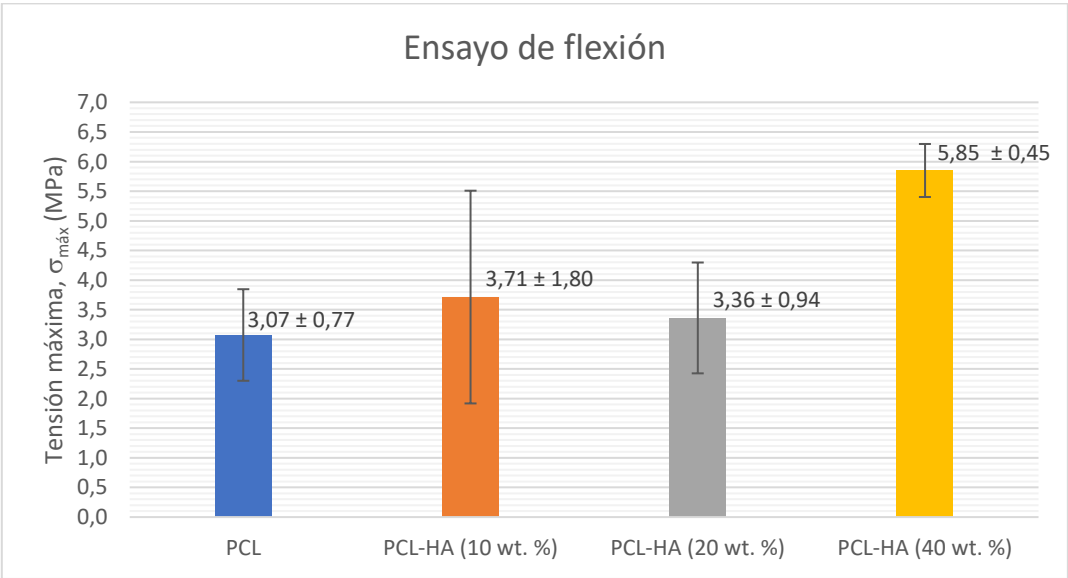
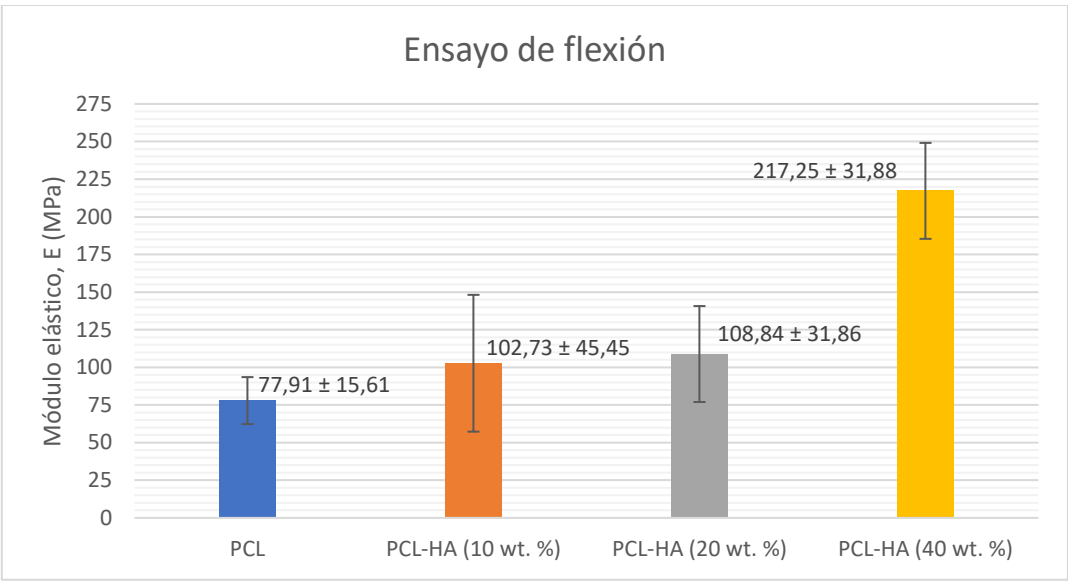
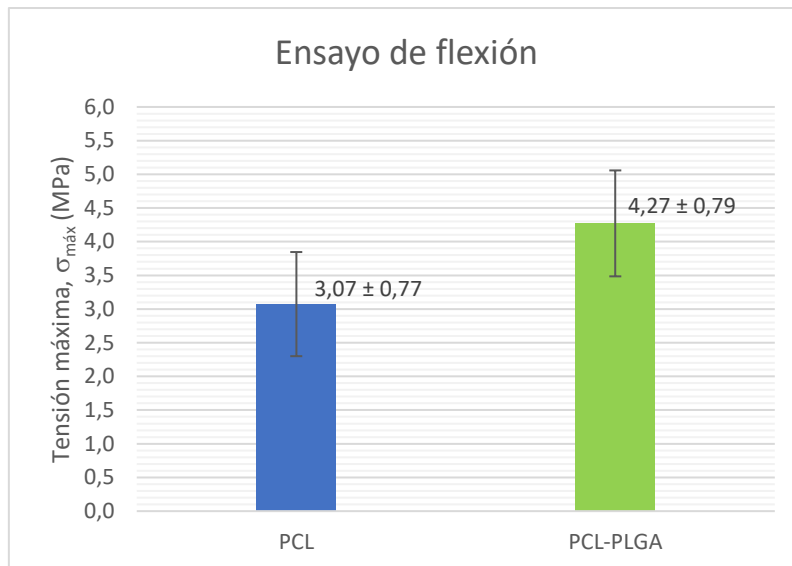


Ilustración 28. Curva fuerza-extensión, ensayo de flexión.

Resultados de flexión:



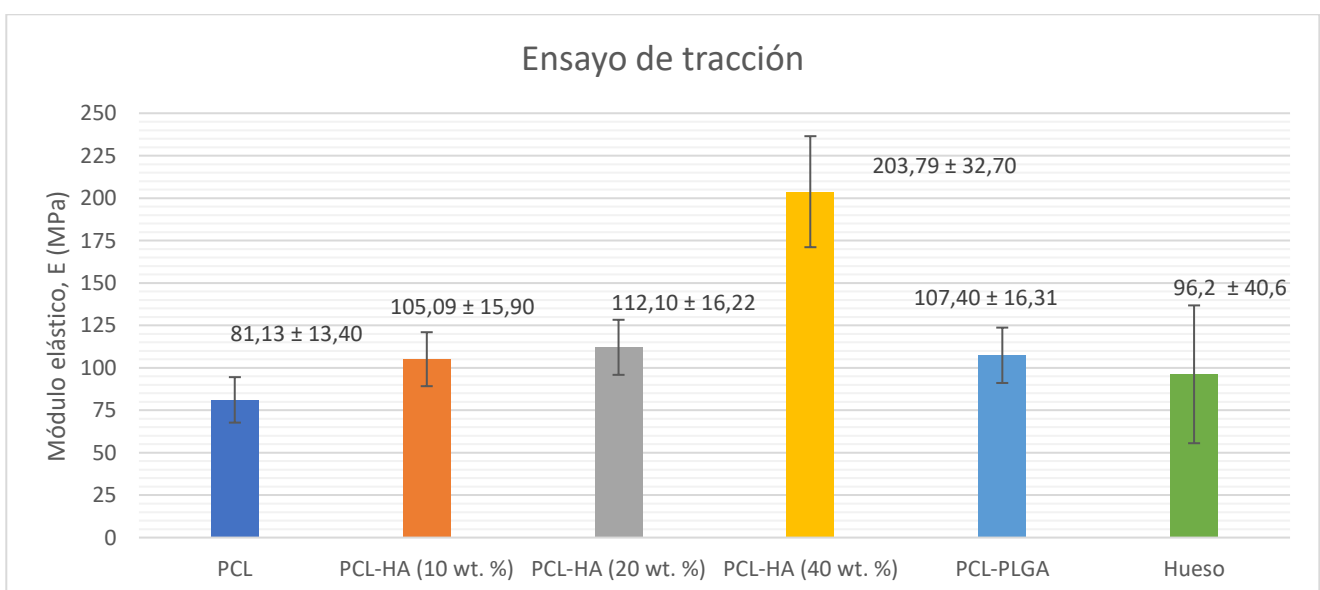


Comparación de las propiedades de los compuestos con las del hueso:

Las propiedades mecánicas del hueso dependen en gran medida de la densidad de éste y de la zona del cuerpo en la que se encuentre, de ahí que los rangos de valores de sus propiedades mecánicas puedan tener gran variación. En los resultados mecánicos de los materiales se puede observar cómo las propiedades varían de uno a otro, en función de la presencia de hidroxiapatita o PLGA. Esto es favorable para poder realizar un ajuste de los materiales en función de la zona ósea a tratar.

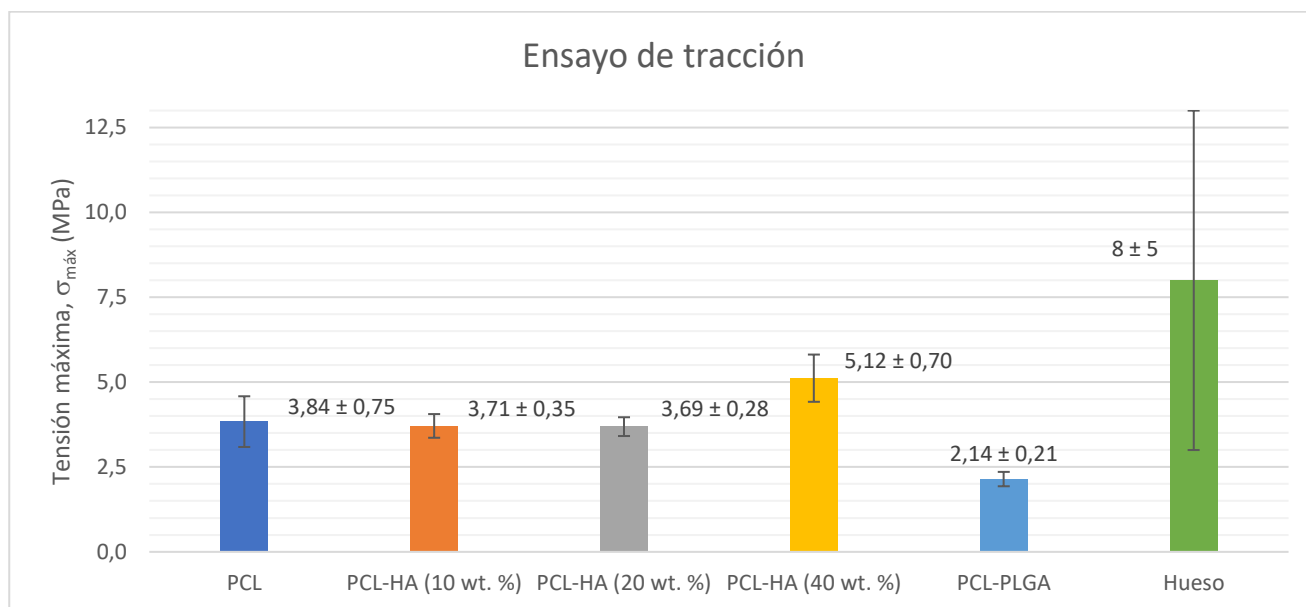
A continuación, se hace una comparación de algunas de las propiedades mecánicas obtenidas en los ensayos y algunas del hueso.

En cuanto al módulo elástico, es necesario que el andamio tenga la mayor similitud posible con el hueso [21], para favorecer una mimetización óptima, y evitar así inconvenientes como el apantallamiento mecánico (provocada por la diferencia de rigidez de los elementos). En este caso, los materiales que más se adecuan al hueso son el PCL-HA al 10/20 wt. % y PCL-PLGA.

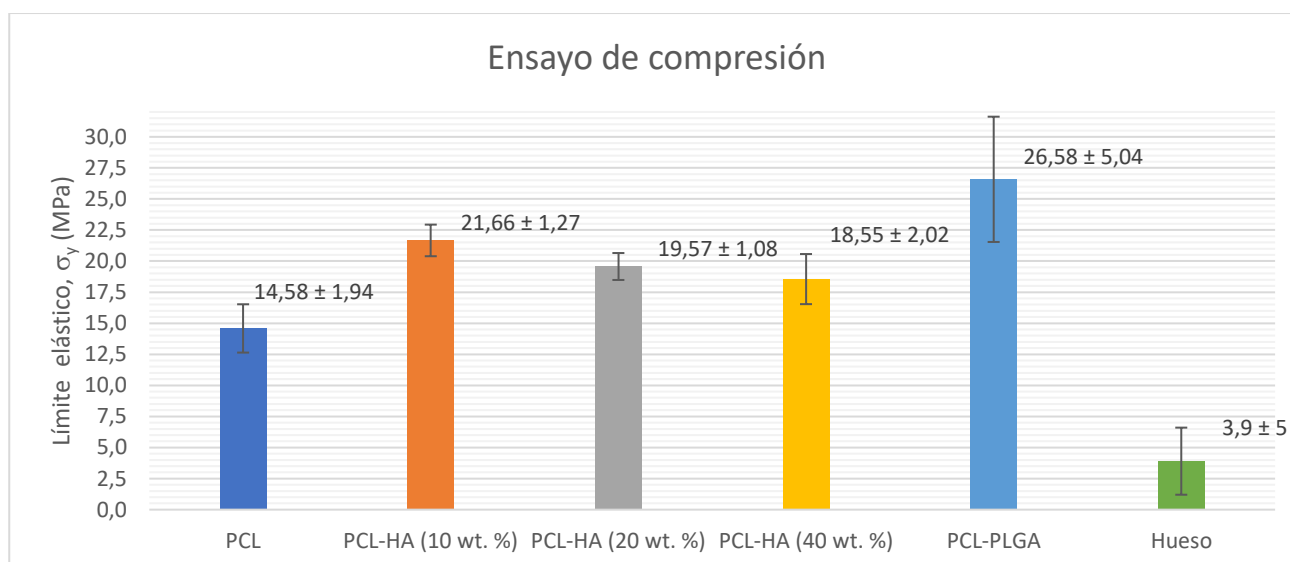


El mayor valor de tensión máxima a tracción lo presenta el PCL-HA 40 wt. %, siendo éste el material más idóneo para soportar estos esfuerzos encontrándose dentro del rango de valores

del hueso [22]. Aumentar la concentración de hidroxiapatita en el material le aporta más resistencia a tracción, a pesar de tener un comportamiento más frágil.



Por otro lado, la resistencia mecánica a compresión también es más adecuada la que presenta hidroxiapatita, a niveles bajos de ésta, y en *blend* de PCL-PLGA. En base a la resistencia a compresión del hueso [21, 23], ha sido positivo en todos los materiales, pero como se comenta, es más adecuado en PCL-HA 10 wt. % y sobretodo en PCL-PLGA.



Resumen de los resultados obtenidos:

- **PCL y PCL-HA**
 - Límite elástico a tracción y el módulo de elasticidad o rigidez a tracción y a flexión aumenta con el incremento de la concentración de hidroxiapatita.
 - La ductilidad del compuesto disminuye a mayor concentración de hidroxiapatita.
 - El módulo de elasticidad y el límite elástico a compresión aumenta con la presencia de hidroxiapatita, disminuyendo al aumentar la concentración de ésta.
 - La tensión máxima a tracción y flexión es similar para valores bajos de hidroxiapatita (10/20 wt. %), apareciendo un aumento a alta concentración (40 wt. %).
 - Así, la presencia de hidroxiapatita en el material supone un refuerzo que provoca la mejora de su resistencia en general, siendo necesario un esfuerzo mayor para provocar su fallo. Sin embargo, la presencia de esta cerámica aporta fragilidad, lo que provoca que el material se vuelva quebradizo y falle con una deformación más baja.
- **PCL y PCL-PLGA**
 - El límite elástico a compresión, la tensión máxima a flexión y el módulo elástico a tracción, flexión y compresión aumenta con la presencia de PLGA.
 - La ductilidad, el límite elástico y la tensión máxima a tracción disminuyen con la presencia de PLGA.
 - Esto es, el PLGA, por su temperatura de transición vítrea más alta que la del PCL, presenta una dureza y fragilidad mayores a temperatura ambiente. Esto explica que el *blend* PCL-PLGA presente una rigidez y resistencia mayor que el PCL aislado y, sin embargo, como era de esperar, la ductilidad cae considerablemente.

4.3.2. Microscopía electrónica de barrido y EDX

A fin de confirmar la presencia y distribución de hidroxiapatita en las probetas porosas impresas (PCL-HA 10 wt. %, PCL-HA 20 wt. % y PCL-HA 40 wt. %), se realizaron imágenes de microscopía electrónica de barrido, así como espectros EDX (Espectrometría de dispersión de energía de rayos X) puntuales y de área en dos zonas separadas de cada probeta (Ilustración 31, Ilustración 32, Ilustración 33 y Ilustración 34).

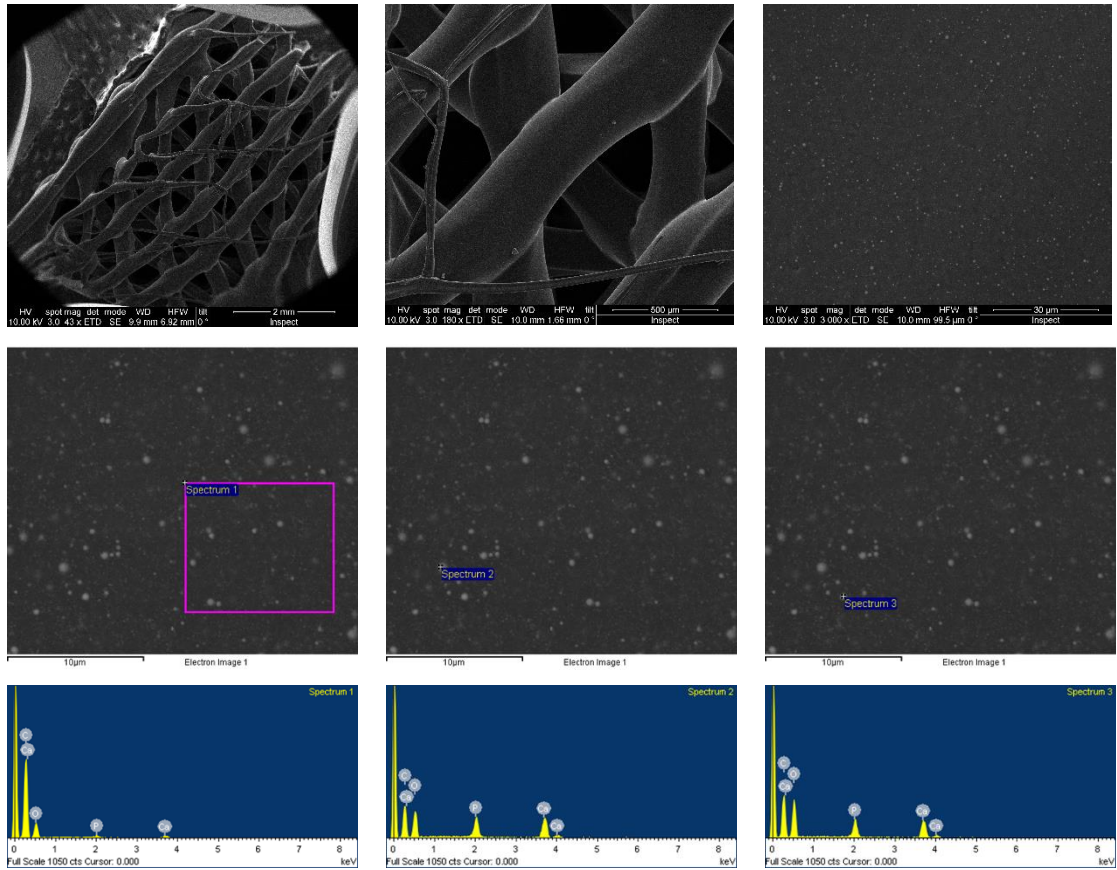


Ilustración 29. Imágenes de SEM y espectros EDX obtenidos en la Zona 1 de la probeta de PCL con un 10% de HA.

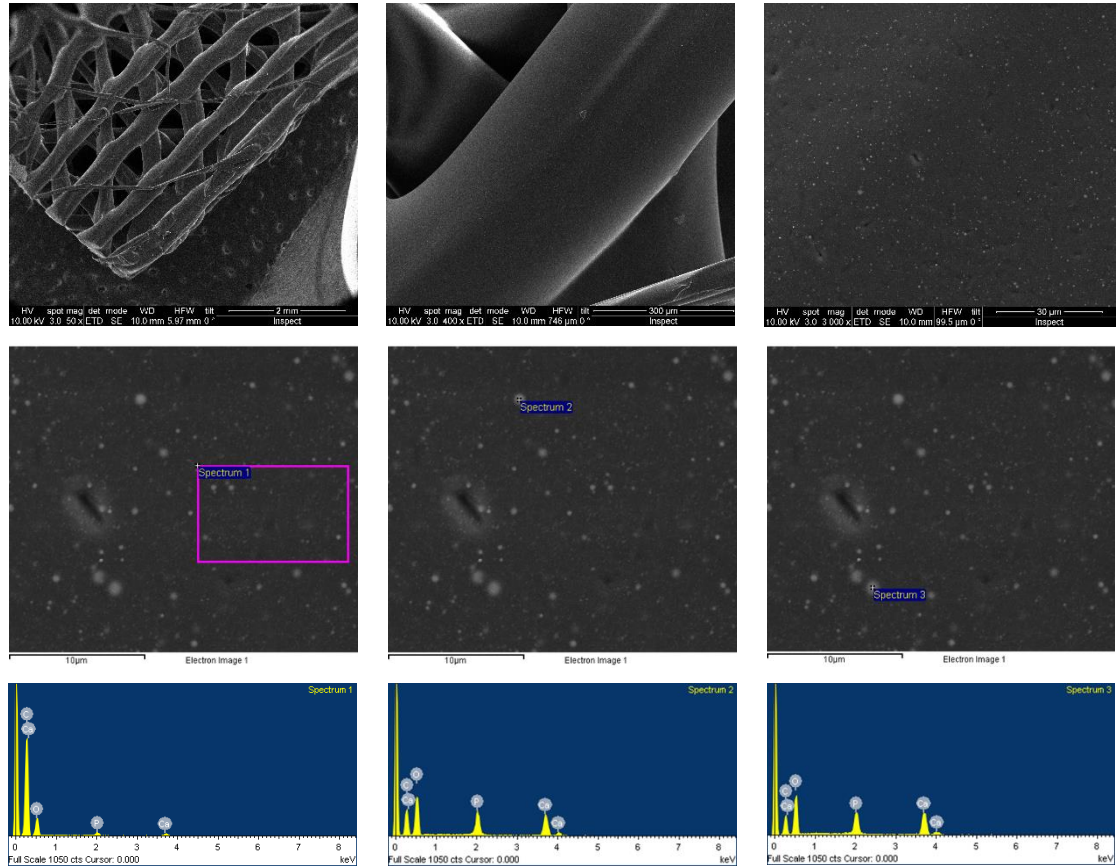


Ilustración 30. Imágenes de SEM y espectros EDX obtenidos en la Zona 2 de la probeta de PCL con un 10% de HA.

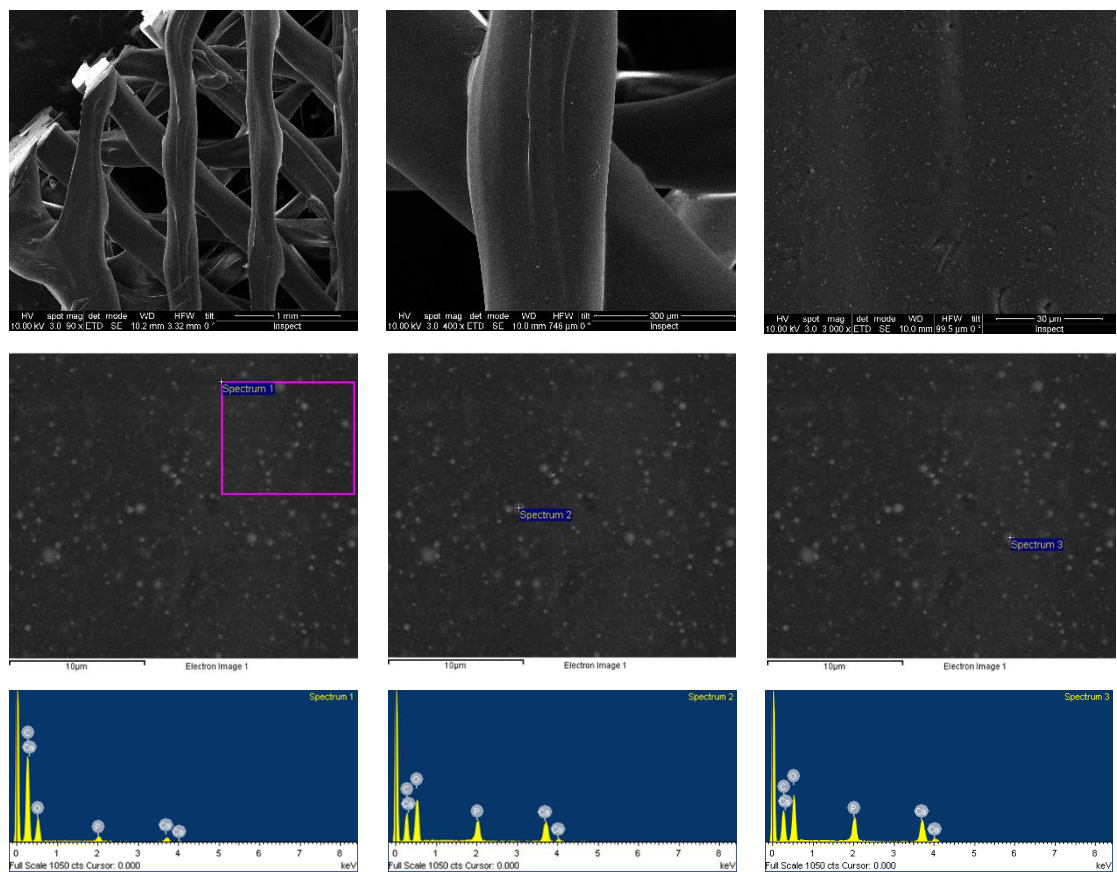


Ilustración 31. Imágenes de SEM y espectros EDX obtenidos en la Zona 1 de la probeta de PCL con un 20% de HA.

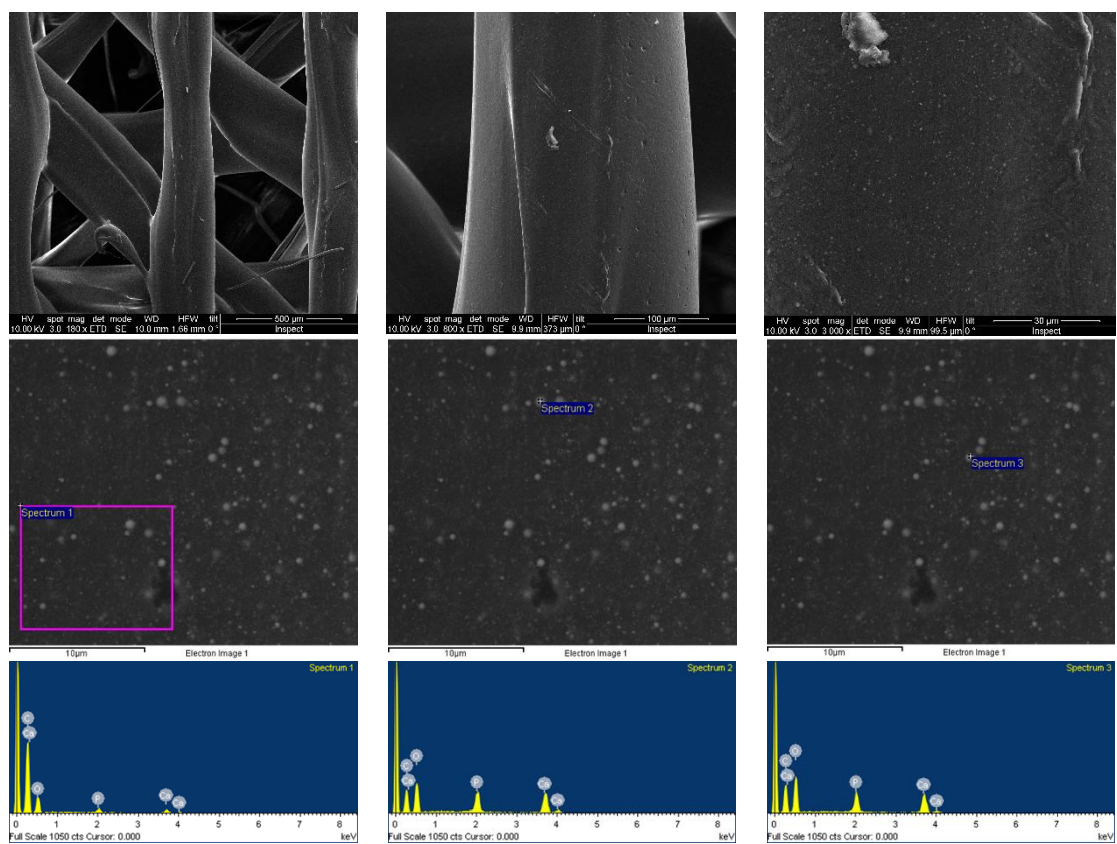


Ilustración 32. Imágenes de SEM y espectros EDX obtenidos en la Zona 2 de la probeta de PCL con un 20% de HA.

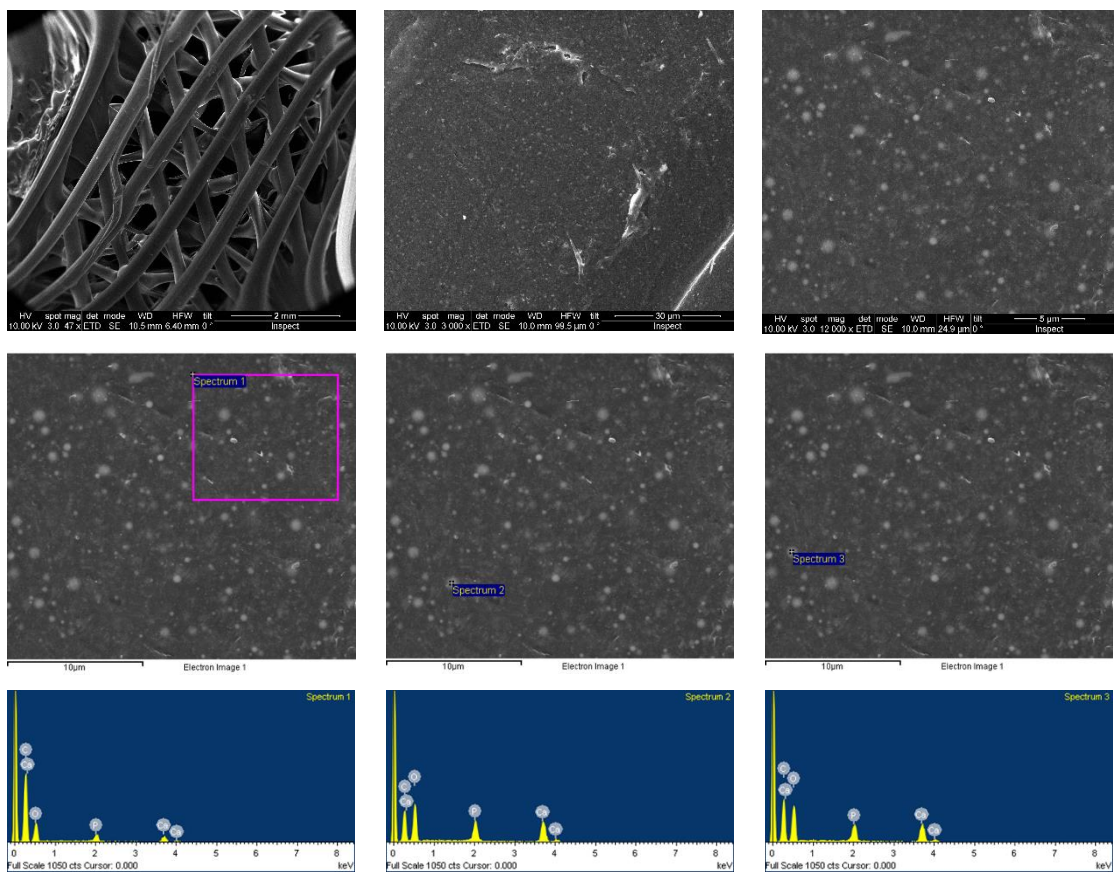


Ilustración 33. Imágenes de SEM y espectros EDX obtenidos en la Zona 1 de la probeta de PCL con un 40% de HA.

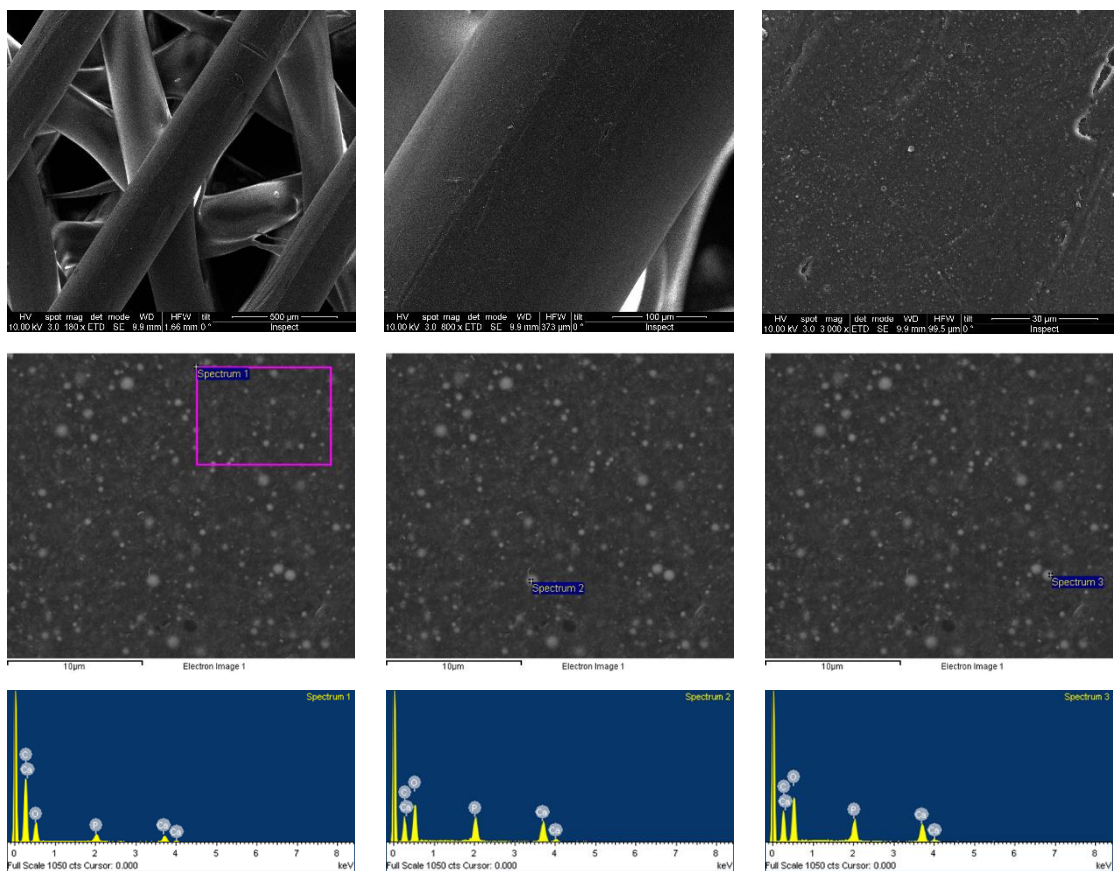


Ilustración 34. Imágenes de SEM y espectros EDX obtenidos en la Zona 2 de la probeta de PCL con un 40% de HA.

En todos los espectros se observó presencia de fósforo y calcio, lo que confirma la presencia de hidroxiapatita (Tabla 7). Para acabar de verificar la presencia de hidroxiapatita, se realizó un cálculo de la proporción estequiométrica entre fósforo y calcio:

	PCL+HA (10%)				PCL+HA (20%)				PCL+HA (40%)			
	Zona 1		Zona 2		Zona 1		Zona 2		Zona 1		Zona 2	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
P (% atómico)	6.6	5.0	7.2	7.9	6.7	3.3	7.9	6.8	6.7	5.4	8.2	6.3
Ca (% atómico)	13.6	10.0	12.8	15.3	11.9	6.5	14.6	12.2	12.7	10.4	13.4	11.1
Ratio P/Ca	0.49	0.50	0.56	0.52	0.56	0.51	0.54	0.56	0.53	0.52	0.61	0.57

Tabla 7. Proporciones estequiométricas entre fósforo y calcio.

Tras analizar cuantitativamente los espectros, se observó una proporción promedio de P/Ca de 0.54±0.03. Dado que la proporción entre fósforo y calcio en la hidroxiapatita es de 0.6 mientras que el fosfato dicálcico es de 0.5, no es posible afirmar cuál de los dos está presente, o si están presentes ambos. Sin embargo, cualquiera de los dos compuestos serían aptos para la aplicación.

También se observó que la señal de fósforo y calcio era más intensa en los puntos de áreas brillantes medidas que en los espectros de zona, lo que significaría que estas áreas brillantes corresponden a nanopartículas o agregados de estas. Para confirmarlo, se comparó la intensidad en una zona de alto brillo respecto a una zona oscura.

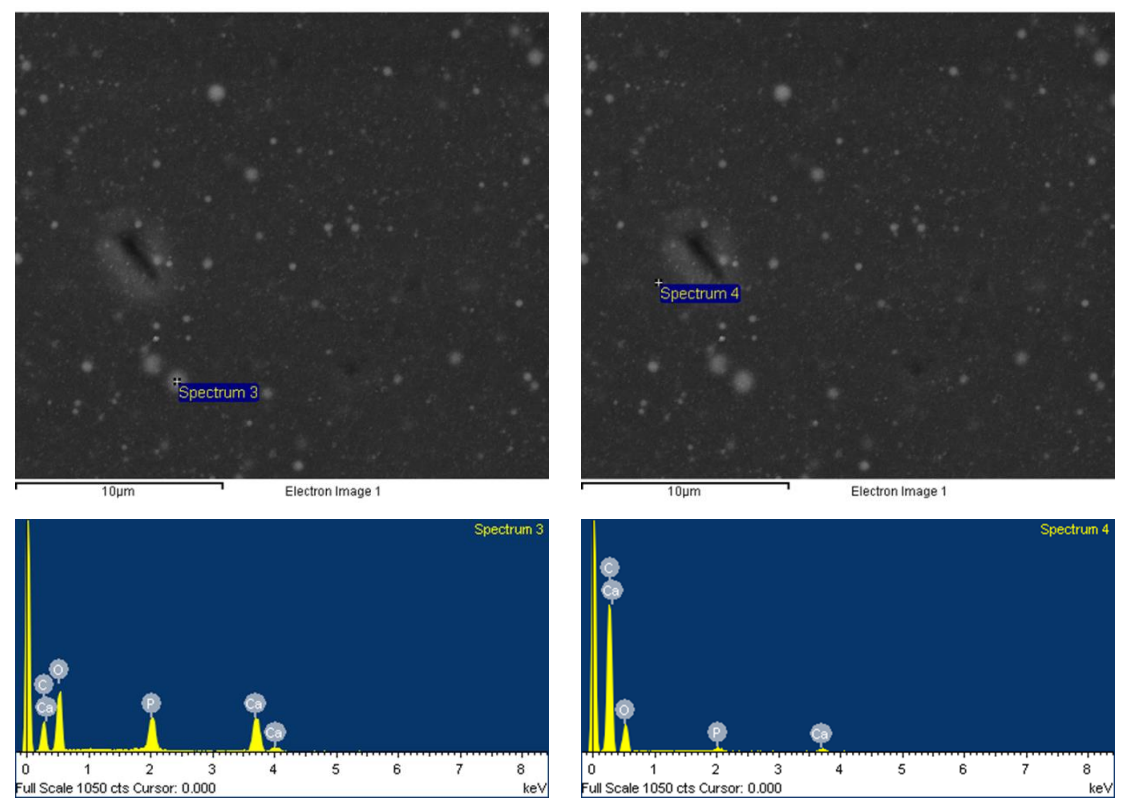


Ilustración 35. Espectros de EDX de una zona de alto brillo (izquierda) y de una de bajo brillo cercana (derecha). Muestra de PCL-HA(10%).

Se observó una caída de las señales correspondientes al fósforo y al calcio, lo que confirma que las áreas brillantes se corresponden con el componente mineral, mientras que la zona oscura se corresponde con la matriz polimérica.

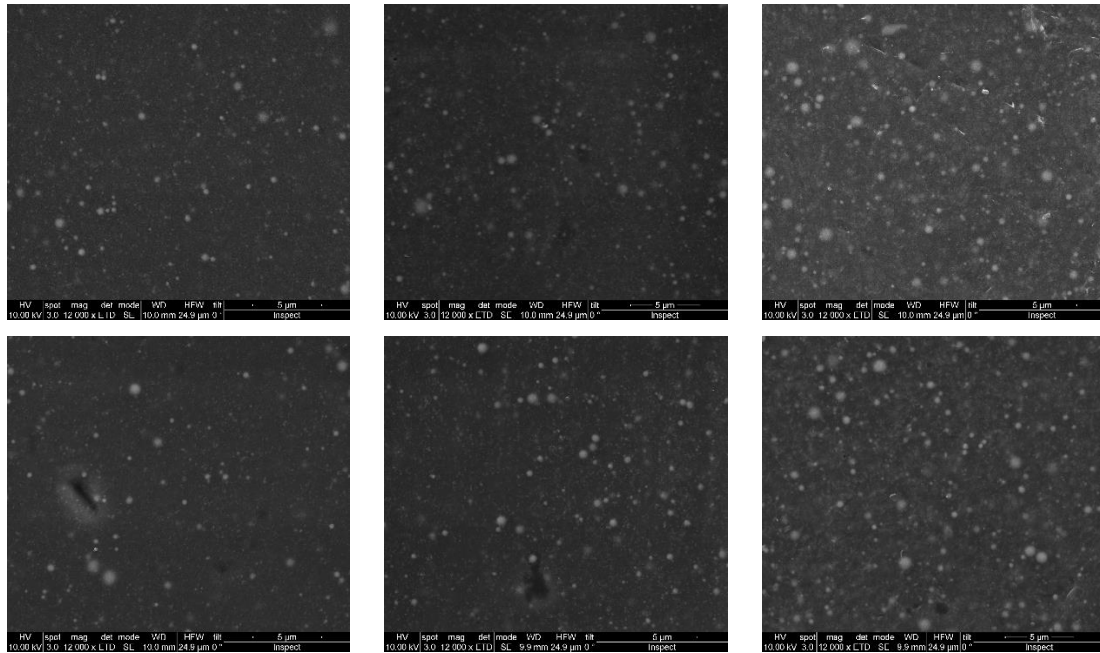


Ilustración 36. Imágenes SEM a 12000 aumentos de PCL-HA(10%) (izquierda), PCL-HA(20%) (centro) y PCL-HA(40%) (derecha).

Si comparamos imágenes de los tres materiales, podemos observar una distribución homogénea de la hidroxiapatita en la superficie de las probetas, aumentando la densidad conforme a la proporción teórica, como era de esperar.

Estos resultados, junto a los obtenidos en los análisis termogravimétricos, nos llevan a concluir que la mezcla de polímero y nanopartículas es homogénea y se mantiene así durante el proceso de extrusión e impresión.

5 Conclusiones y trabajo futuro

5.1 Conclusiones:

Tras la línea de estudio y experimental seguida en este trabajo, se ha llegado a una serie de conclusiones que han perseguido, como se ha ido comentando, conseguir los requisitos necesarios para aplicaciones médicas de regeneración ósea:

- Se ha demostrado la posibilidad de imprimir andamios porosos con un tamaño de poro controlado mediante deposición de material fundido.
- Se ha extruido con éxito filamentos de PCL, PCL-HA (10/20/40 wt. %), PCL-PLGA (50-50 %) y PCL-PLGA-HA (30/30/40 %), compatible con impresoras 3D FDM.
- Se han impreso con éxito probetas porosas de PCL, PCL-HA (10/20/40 wt. %) y PCL-PLGA (50-50 %).
- Se ha comprobado a partir de microscopía electrónica (SEM) y espectroscopía EDX la buena dispersión de hidroxiapatita en la matriz de polímero, asegurando la presencia de la misma o en su defecto, difosfato tricálcico, también compuesto apto para esta aplicación.
- Tras los ensayos mecánicos de las probetas, se ha comprobado la mejora de las propiedades mecánicas con la presencia de hidroxiapatita, como el módulo de elasticidad y el límite elástico a tracción y flexión. Siendo el material PCL-HA 40 wt. % el que mejor se ajusta con el módulo elástico del hueso y el que presenta mayor tensión máxima a tracción y flexión.
- Tras los ensayos se ha comprobado cómo la presencia de PLGA en el compuesto mejora las propiedades mecánicas a tracción y compresión y empeora las de tracción.
- En función de las concentraciones de hidroxiapatita, o de la presencia o no de PLGA, se obtienen distintos valores de las propiedades mecánicas para cada material. Esto permite un ajuste de éstas adaptadas a la zona ósea a tratar.

5.2 Trabajo Futuro:

Como líneas futuras al presente trabajo se puede mencionar:

- Analizar la influencia del tamaño de poro y la geometría porosa en las propiedades mecánicas de los andamios.
- Reducir la cantidad de HA en el PCL/PLGA/HA con el fin de reducir su fragilidad manteniendo su capacidad bioactiva.
- Probar NPs de titanio como refuerzo en lugar de HA y comparar sus propiedades.
- Hacer estudios de degradabilidad de los materiales en medios fisiológicos simulados.
- Estudiar la citotoxicidad de los andamios in vitro.

6 **Bibliografía**

- [1] R. Couto *et al.*, "3D Printed Scaffolds as a New Perspective for Bone Tissue Regeneration : Literature Review," no. August, pp. 430–452, 2016.
- [2] A. Roffi, G. S. Krishnakumar, N. Gostynska, E. Kon, C. Candrian, and G. Filardo, "The Role of Three-Dimensional Scaffolds in Treating Long Bone Defects: Evidence from Preclinical and Clinical Literature - A Systematic Review," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, 2017.
- [3] «Injerto cresta ilíaca» Disponible en: <http://www.1888implant.com/images/autograft2.jpg>
- [4] M. M. Stevens, "Biomaterials for bone tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 11, no. 5, pp. 18–25, 2008.
- [5] «The bone remodelling process» Disponible en: <https://medicalxpress.com/news/2017-03-non-coding-rna-molecule-role-osteoporosis.html>
- [6] J. O. Gordeladze, H. J. Haugen, S. P. Lyngstadaas, and J. E. Reseland, "Bone Tissue Engineering : State of the Art, Challenges, and Prospects," 2017.
- [7] M. A. Velasco, C. A. Narváez-tovar, and D. A. Garzón-alvarado, "Design , Materials , and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering," vol. 2015, 2015.
- [8] F. Baino, G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, "Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, no. December, pp. 1–17, 2015.
- [9] L. Malladi, A. Mahapatro, and A. S. Gomes, "Fabrication of magnesium-based metallic scaffolds for bone tissue engineering," *Mater. Technol.*, vol. 7857, no. December, pp. 1–10, 2017.
- [10] S. A. Park, S. H. Lee, and W. D. Kim, "Fabrication of porous polycaprolactone/hydroxyapatite (PCL/HA) blend scaffolds using a 3D plotting system for bone tissue engineering," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 34, no. 4, pp. 505–513, 2011.
- [11] S. C. Rizzi, D. J. Heath, A. G. A. Coombes, N. Bock, M. Textor, and S. Downes, "Biodegradable polymer / hydroxyapatite composites : Surface analysis and initial attachment of human osteoblasts," *J Biomed Mater Res*, vol. 55, pp. 475–486, 2001.
- [12] R. Couto *et al.*, "3D Printed Scaffolds as a New Perspective for Bone Tissue Regeneration : Literature Review," no. August, pp. 430–452, 2016.
- [13] B. Thavornnyutikarn, N. Chantarapanich, K. Sitthiseripratip, G. A. Thouas, and Q. Chen, "Bone tissue engineering scaffolding: computer-aided scaffolding techniques," vol. 3, no. 2–4, 2014.
- [14] Van Vlierberghe, S., Dubruel, P. and Schacht, E. (2011) Biopolymer-Based Hydrogels as Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 12, 1387-1408.
- [15] H. N. Chia and B. M. Wu, "Recent advances in 3D printing of biomaterials," *J. Biol. Eng.*, vol. 9, no. 1, p. 4, 2015.
- [16] «ABS Filament for 3D Printers - 1.75mm Diameter - White - 1KG ID: 2069 - \$39.95 : Adafruit Industries, Unique & fun DIY electronics and kits». Disponible en: <https://www.adafruit.com/product/2069>.

- [17] «autograft2.jpg (JPEG Image, 250 × 204 pixels)». Disponible en: <http://www.1888implant.com/images/autograft2.jpg>.
- [18] «Non-coding RNA molecule could play a role in osteoporosis». Disponible en: <https://medicalxpress.com/news/2017-03-non-coding-rna-molecule-role-osteoporosis.html>.
- [19] M. Jafari et al., “Polymeric scaffolds in tissue engineering: A literature review,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, pp. 2015–2016, 2015.
- [20] «Proceso de extrusión» Disponible en: <http://www.mechscience.com/extrusion/>
- [21] C. E. Misch, Z. Qu, and M. W. Bidez, “Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: Implications for dental implant treatment planning and surgical placement,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 57, no. 6, pp. 700–706, 1999.
- [22] L. Malladi, A. Mahapatro, and A. S. Gomes, “Fabrication of magnesium-based metallic scaffolds for bone tissue engineering,” *Mater. Technol.*, vol. 7857, no. December, pp. 1–10, 2017.
- [23] F. Baino, G. Novajra, and C. Vitale-Brovarone, “Bioceramics and Scaffolds: A Winning Combination for Tissue Engineering,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 3, no. December, pp. 1–17, 2015.
- [24] A. H. Yusop, A. A. Bakir, N. A. Shaharom, M. R. A. Kadir, and H. Hermawan, “Porous Biodegradable Metals for Hard Tissue Scaffolds : A Review,” vol. 2012, 2012.
- [25] H. Man, P. K. Chu, F. K. L. Leung, K. M. C. Cheung, K. D. K. Luk, and K. W. K. Yeung, “Engineered polycaprolactone – magnesium hybrid biodegradable porous scaffold for bone tissue engineering,” *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 24, no. 5, pp. 561–567, 2014.
- [26] S.-I. Roohani-Esfahani, P. Newman, and H. Zreiqat, “Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 19468, 2016.
- [27] D. Guede, P. González, and J. R. Caeiro, “Biomecánica y hueso (I): Conceptos básicos y ensayos mecánicos clásicos,” *Rev. Osteoporos. y Metab. Miner.*, vol. 5, no. 1, pp. 43–50, 2013.
- [28] J. Korpela, A. Kokkari, H. Korhonen, M. Malin, T. Narhi, and J. Seppälä, “Biodegradable and bioactive porous scaffold structures prepared using fused deposition modeling,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 101, no. 4, pp. 610–619, 2013.
- [29] S. J. Kalita, S. Bose, H. L. Hosick, and A. Bandyopadhyay, “Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 23, no. 5, pp. 611–620, 2003.
- [30] E. Nyberg, A. Rindone, A. Dorafshar, and W. L. Grayson, “Comparison of 3D-Printed Poly-ε-Caprolactone Scaffolds Functionalized with Tricalcium Phosphate, Hydroxyapatite, Bio-Oss, or Decellularized Bone Matrix <sup>/>,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 23, no. 11–12, pp. 503–514, 2017.
- [31] L. Roseti et al., “Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 1246–1262, 2017.

A. ANEXOS

Funcionamiento, componentes y conexión de la extrusora.

La extrusión, como se ha comentado en apartados anteriores, es un proceso de compresión en el que el material fundido (o viscoelástico) es forzado a fluir a través de un orificio de troquel para proporcionar un producto largo y continuo por la acción giratoria de un husillo (Ilustración 37).

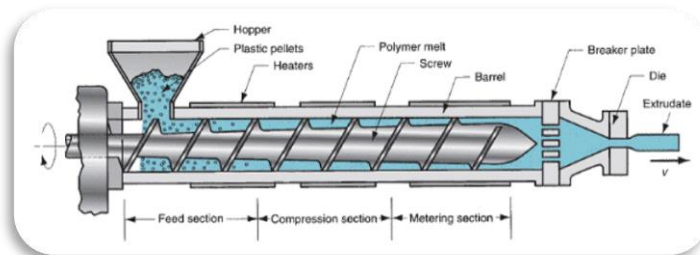


Ilustración 37. Proceso de extrusión.

El sistema por el cual está formada una extrusora se puede dividir principalmente en dos bloques, por un lado se diferenciará de los elementos mecánicos y, por otro los electrónicos como se muestra a continuación. Se detallarán aquellos que han sido fabricados (taller mecánico edificio i3a).

Mecánica de la extrusora.

- Cilindro o Cámara de fusión y extrusión del material: encargada de albergar los cartuchos calefactores y termistores, los cuales se encargarán del calentamiento controlado del material y de aportar información de dichas temperaturas. A través de él pasará el husillo desplazando el material fundido. Elemento mecanizado partiendo de una base de aluminio. Por un lado, la cámara con un orificio de XX mm de diámetro y por otro, la base de sujeción de ésta y el motor.
- Tornillo o husillo de extrusión: encargado de hacer pasar el material por el hueco de la cámara hasta el orificio de salida. Pieza comercial.
- Soporte: base rectangular para la sujeción de la cámara, el motor y la reductora. Se mecanizó en el mismo taller que la cámara partiendo de una base de aluminio.
- Soporte general: estructura formada por la unión de tableros de aglomerado encargada de soportar todos los elementos.
- Motor "Wantai 57BYGH420": motor paso a paso encargado de convertir una serie de impulsos eléctricos en desplazamientos angulares discretos (1.8° por impulso). Este tipo de motor trabaja a menor velocidad pero con una mejor precisión.
- Reductora: permite aportar el par necesario al motor para conseguir una adecuada extrusión.
- Ventilador y bañera de agua: forman el sistema de refrigeración. La refrigeración por aire se realiza con un ventilador y, la recogida en agua se realiza con una probeta.

A continuación, en la Ilustración 39, se muestran las distintas partes de la extrusora.

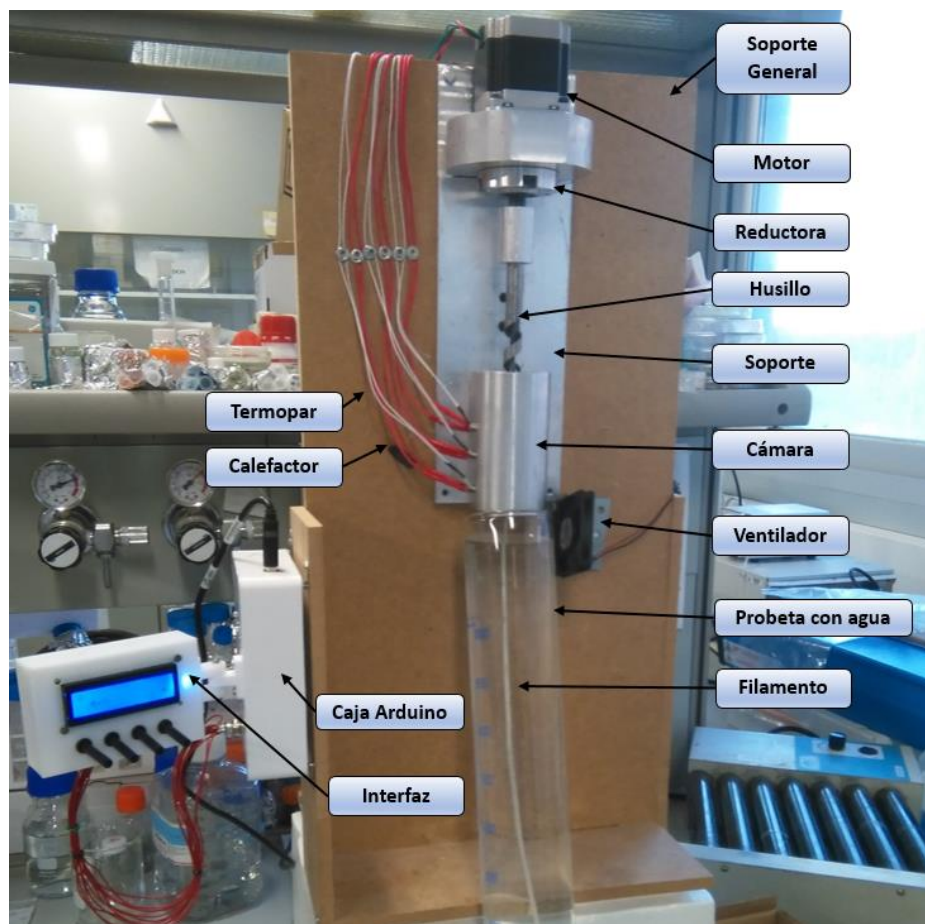


Ilustración 38. Plano general de la extrusora.

En cuanto a la parte electrónica, puesta a punto por Martín Prieto Fraga, se diferencian:

- Controlador Arduino Mega 2560: centro de procesamiento de la información del sistema donde se encuentra el programa encargado de elegir las salidas a dar en función de las entradas.
- Driver DQ542MA: es un driver diseñado para el uso con motores paso a paso de dos fases. Se encarga de mandar órdenes al motor de encendido, giro y pulsos. Es el encargado de unir el controlador Arduino y el motor.
- Tres relés: permitirán el paso de corriente hacia los calefactores mediante la orden del controlador, siendo a su vez informado por los termistores.
- Interfaz: dispositivo visual que presentará las tres temperaturas de consigna y la velocidad del motor, controlables mediante los potenciómetros, junto con las tres temperaturas reales del sistema y la temperatura a la salida de la extrusora (aportadas por los termopares).
- Potenciómetros: resistencias variables para el control de las temperaturas de consigna y velocidad del motor.
- Tres cartuchos calefactores: fuente de energía térmica encargada de llevar al material al punto de fusión. Estos serán controlados a partir de unos potenciómetros que permitirán de forma individual la selección de las temperaturas de consigna de cada cartucho.

- Cuatro termistores: estos serán encargados de aportar la información al controlador de la temperatura existente en la cámara de modo que, se actuarán los calefactores en función de las diferencias con las temperaturas de consignas elegidas en la interfaz.
- Fuentes de alimentación: base de energía para cada elemento.

El funcionamiento de este sistema comienza con la selección de las temperaturas de consigna y velocidad de motor que se desea para el proceso. A partir de este momento los calefactores calientan la cámara hasta llegar a esta temperatura. Una vez superada esta temperatura los relés son encargados de desactivar el paso de corriente, permitiendo así no sobrepasar la temperatura de consigna. En el caso de que la temperatura de la cámara disminuya por debajo de la temperatura de consigna, el relé vuelve a permitir el paso de corriente, activando el calefactor. Este proceso se repite continuamente.

La conexión básica de este sistema electrónico se detalla en la Ilustración 39.

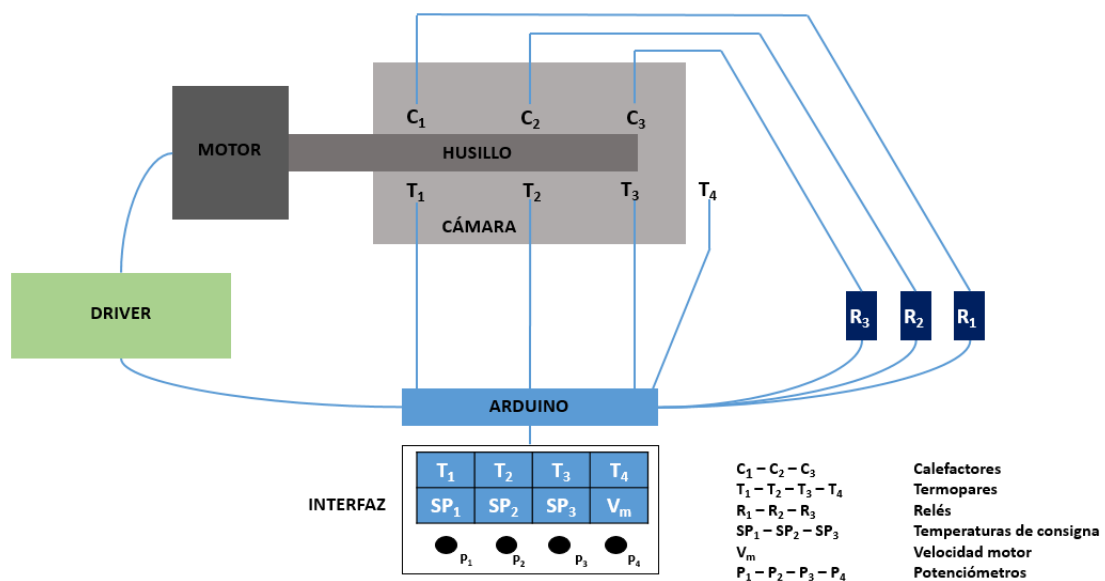


Ilustración 39. Esquema electrónico de la extrusora.

Ensayos de tracción		Ajuste lineal			Rigidez	Límite elástico	Tensión máx.	Deformación máxima	Ductilidad
		y = a + bx		R²	E	σ _y	σ _{máx}	ε _{máx}	%EL
		Muestras	a		b	(MPa)	(MPa)	(MPa)	
PCL	1	0,02363 ± 0,00333	91,55892 ± 0,28969	0,99879	91,56	3,47	4,35	1,44	144,08
	2	-0,02548 ± 0,00134	62,43818 ± 0,11713	0,99957	62,44	2,49	2,56	0,68	68,18
	3	0,01358 ± 0,00239	72,3118 ± 0,2078	0,999	72,31	2,84	4,28	1,44	143,93
	4	0,0225 ± 0,00291	93,96162 ± 0,25392	0,99912	93,96	3,67	4,20	1,04	104,27
	5	0,04577 ± 0,00434	85,36078 ± 0,37829	0,99763	85,36	3,16	3,80	1,23	122,62
				MEDIA	81,13	3,13	3,84	1,17	116,62
				DESVIACIÓN	13,40	0,48	0,75	0,32	31,76
PCL-HA (10 wt. %)	1	0,0822 ± 0,00745	110,07243 ± 0,64362	0,99585	110,07	3,72	4,00	0,89	89,00
	2	-0,04078 ± 0,00251	100,3857 ± 0,21693	0,99943	100,39	3,80	3,87	0,56	56,46
	3	0,04954 ± 0,00684	129,43038 ± 0,59563	0,99744	129,43	4,01	4,01	0,46	45,60
	4	0,0367 ± 0,00491	98,65429 ± 0,42792	0,99773	98,65	3,27	3,36	1,80	179,97
	5	-0,03355 ± 0,0024	86,92546 ± 0,20904	0,9993	86,93	3,08	3,31	1,31	130,70
				MEDIA	105,09	3,57	3,71	1,00	100,35
				DESVIACIÓN	15,90	0,39	0,35	0,55	55,48
PCL-HA (20 wt. %)	1	0,03244 ± 0,0023	101,01802 ± 0,20038	0,99952	101,02	3,49	3,79	0,92	92,03
	2	0,12227 ± 0,01115	136,57256 ± 0,96319	0,99397	136,57	4,00	4,11	0,30	29,54
	3	0,11064 ± 0,00949	112,23627 ± 0,82008	0,99353	112,24	6,22	3,44	0,50	50,27
	4	0,06221 ± 0,00768	116,27459 ± 0,66334	0,99605	116,27	3,36	3,65	0,63	63,00
	5	0,08172 ± 0,00763	94,41437 ± 0,65913	0,99409	94,41	3,16	3,46	0,65	64,83
				MEDIA	112,10	4,05	3,69	0,60	59,93
				DESVIACIÓN	16,22	1,25	0,28	0,23	22,81
PCL-HA (40 wt. %)	1	0,34438 ± 0,02775	186,50575 ± 2,39694	0,98025	186,51	4,77	4,91	0,16	15,59
	2	0,44231 ± 0,03953	253,68878 ± 3,4153	0,97837	253,69	6,05	6,26	0,15	14,88
	3	0,36623 ± 0,02935	198,97386 ± 2,53572	0,98057	198,97	4,91	5,03	0,12	11,76
	4	0,52901 ± 0,04341	213,09924 ± 3,75097	0,96358	213,10	4,97	5,01	0,10	10,41
	5	0,23789 ± 0,01945	166,67207 ± 1,68085	0,98774	166,67	4,20	4,37	0,13	12,52
				MEDIA	203,79	4,98	5,12	0,13	13,03
				DESVIACIÓN	32,70	0,67	0,70	0,02	2,16

PCL-PLGA	1	0,2652 ± 0,02887	96,5067 ± 2,51611	0,924	96,51	1,70	1,85	0,26	25,78
	2	0,22841 ± 0,01931	87,63222 ± 1,68241	0,95731	87,63	1,98	2,10	0,14	13,95
	3	0,33543 ± 0,03584	126,11522 ± 3,12209	0,93096	126,12	2,41	2,43	0,19	18,70
	4	0,31244 ± 0,02807	105,18083 ± 2,44532	0,93861	105,18	2,20	2,22	0,41	41,08
	5	0,31484 ± 0,03311	121,54294 ± 3,20763	0,92944	121,54	2,01	2,12	0,22	21,68
				MEDIA	107,40	2,06	2,14	0,24	24,24
				DESVIACIÓN	16,31	0,27	0,21	0,10	10,36

Ensayos de compresión		Ajuste lineal			Rigidez	Límite elástico
		y = b + ax		R²	E	σ _y
					(MPa)	(MPa)
Muestras	a	b				
PCL	1	-9,81385 ± 0,01365	161,3295 ± 0,13287	0,9985	161,33	14,21
	2	-8,2241 ± 0,02129	154,72574 ± 0,20762	0,99578	154,73	12,71
	3	-4,80753 ± 0,02273	131,3482 ± 0,24822	0,99285	118,73	12,93
	4	-21,66595 ± 0,01725	243,69946 ± 0,1425	0,99967	243,70	17,29
	5	-8,23599 ± 0,01705	182,83162 ± 0,19241	0,99816	182,83	15,77
				MEDIA	172,26	14,58
				DESVIACIÓN	46,12	1,94
PCL-HA (10 wt. %)	1	-24,746 ± 0,01046	302,57102 ± 0,09644	0,9999	302,57	22,41
	2	-13,25318 ± 0,0171	256,53054 ± 0,20144	0,99927	256,53	20,41
	3	-22,81617 ± 0,02447	249,81424 ± 0,19503	0,99926	249,81	20,15
	4	-40,3286 ± 0,05273	313,35479 ± 0,33898	0,99861	313,35	22,71
	5	-41,69673 ± 0,06327	303,70045 ± 0,37817	0,99741	303,70	22,64
				MEDIA	285,19	21,66
				DESVIACIÓN	29,63	1,27
PCL-HA (20 wt. %)	1	-32,11052 ± 0,02805	249,64494 ± 0,16947	0,99942	249,65	19,27
	2	-26,48922 ± 0,01701	233,4726 ± 0,1139	0,99962	233,47	19,70
	3	-35,7763 ± 0,05441	262,10422 ± 0,33021	0,99756	262,10	19,65
	4	-38,67691 ± 0,03237	299,1346 ± 0,20279	0,99955	299,13	21,12
	5	-25,45377 ± 0,02529	206,04641 ± 0,15371	0,99924	206,05	18,09
				MEDIA	250,08	19,57
				DESVIACIÓN	34,52	1,08
PCL-HA (40 wt. %)	1	-29,42648 ± 0,02447	254,19274 ± 0,15854	0,99948	254,19	21,68
	2	-35,92387 ± 0,02588	250,94759 ± 0,15248	0,99961	250,95	16,07
	3	-26,50053 ± 0,02971	251,26112 ± 0,21994	0,99898	251,26	18,37
	4	-20,46694 ± 0,05358	233,22658 ± 0,48273	0,99477	233,23	18,60
	5	-25,4174 ± 0,01894	235,22639 ± 0,13354	0,99946	235,23	18,04
				MEDIA	244,97	18,55
				DESVIACIÓN	9,91	2,02

PCL-PLGA	1	-24,88126 ± 0,01786	299,57319 ± 0,1354	0,99961	299,57	29,06
	2	-29,87405 ± 0,01635	367,11246 ± 0,12976	0,99984	367,11	29,75
	3	-14,25925 ± 0,03679	158,11543 ± 0,27979	0,99174	158,12	17,92
	4	-18,80454 ± 0,05068	226,2556 ± 0,3835	0,99235	226,26	26,37
	5	-28,59713 ± 0,04307	297,20982 ± 0,31837	0,9973	297,21	29,81
				MEDIA	269,65	26,58
				DESVIACIÓN	79,81	5,04

Ensayos de flexión		Ajuste lineal			Rigidez	Tensión máx.
		y = a + bx		R²	E	σ _{máx}
					(MPa)	(MPa)
Muestras	a	b				
PCL	1	0,00207 ± 5,04297E-4	0,08989 ± 2,95055E-4	0,99984	66,25147406	2,492900943
	2	8,44379E-4 ± 8,52071E-4	0,08535 ± 5,12626E-4	0,9995	62,90536557	2,199056604
	3	0,00108 ± 6,69829E-4	0,1116 ± 3,97861E-4	0,99977	82,25235849	3,483785377
	4	0,00239 ± 4,5229E-4	0,10305 ± 2,63766E-4	0,99989	75,95076651	3,060283019
	5	0,00174 ± 6,34865E-4	0,13868 ± 3,74856E-4	0,99984	102,2110849	4,130872642
				MEDIA	77,91	3,07
				DESVIACIÓN	15,61	0,77
PCL-HA (10 wt. %)	1	9,76421E-4 ± 3,86745E-4	0,12161 ± 2,21339E-4	0,99993	89,63	3,49
	2	0,00367 ± 0,00128	0,09181 ± 7,75576E-4	0,99893	67,67	2,27
	3	0,00131 ± 4,46776E-4	0,24758 ± 2,63461E-4	0,99998	182,47	6,83
	4	0,00475 ± 0,00132	0,11617 ± 7,79535E-4	0,99915	85,62	3,06
	5	0,00298 ± 6,65343E-4	0,11976 ± 3,9906E-4	0,99979	88,27	2,92
				MEDIA	102,73	3,71
				DESVIACIÓN	45,45	1,80
PCL-HA (20 wt. %)	1	0,00622 ± 0,0014	0,16659 ± 8,46949E-4	0,99933	122,78	3,06
	2	0,0054 ± 0,00134	0,10097 ± 8,26614E-4	0,99893	74,42	2,57
	3	0,00343 ± 0,00218	0,10217 ± 0,00127	0,99739	75,30	2,49
	4	0,01104 ± 0,00184	0,1938 ± 0,00112	0,99901	142,84	4,56
	5	0,00576 ± 8,98442E-4	0,17485 ± 5,20114E-4	0,99975	128,87	4,13
				MEDIA	108,84	3,36
				DESVIACIÓN	31,86	0,94
PCL-HA (40 wt. %)	1	0,02586 ± 0,00441	0,28016 ± 0,0027	0,99602	206,49	5,12
	2	0,0236 ± 0,00318	0,29161 ± 0,00192	0,99806	214,92	5,98
	3	0,00507 ± 9,8007E-4	0,23498 ± 5,71004E-4	0,99978	173,19	5,75
	4	0,02209 ± 0,00324	0,31515 ± 0,00192	0,99818	232,27	6,12
	5	0,02982 ± 0,00444	0,35195 ± 0,00269	0,99686	259,40	6,26
				MEDIA	217,25	5,85
				DESVIACIÓN	31,88	0,45

PCL-PLGA	1	0,03572 ± 0,0059	0,30442 ± 0,00371	0,99321	224,37	3,77
	2	0,01118 ± 0,00125	0,31429 ± 7,26223E-4	0,99974	231,64	4,56
	3	0,02282 ± 0,00345	0,35385 ± 0,00208	0,99814	260,80	5,19
	4	0,01469 ± 0,0024	0,31421 ± 0,00143	0,99901	231,58	4,64
	5	0,00833 ± 0,00268	0,22786 ± 0,00161	0,99825	167,94	3,19
				MEDIA	223,27	4,27
				DESVIACIÓN	33,95	0,79